

Caracterització de l'efecte de metalls pesants en la degradació d'Hidrocarburs Aromàtics Policíclics en sòls contaminats

Memòria del Projecte de fi de carrera de Ciències
Ambientals

Anna Jordà Bonet
Setembre 2012

Dirigida per:

Cristina Palet Ballús
Oriol Baltrons Rosell

ÍNDEX

| | |
|---|-----------|
| 1. Introducció..... | 1 |
| 1.1 <i>Els PAHs i els HM.....</i> | <i>1</i> |
| 1.1.1. Els PHAs..... | 1 |
| 1.1.2. Els HM..... | 4 |
| 1.2 <i>Tècniques d'extracció – separació.....</i> | <i>6</i> |
| 1.2.1 Cromatografia..... | 6 |
| 1.2.2 Extracció assistida per microones (MAE)..... | 10 |
| 1.2.3 Concentració amb evaporador rotatori..... | 12 |
| 1.2.4 Sililació amb bany de silicona..... | 12 |
| 2. Objectius..... | 14 |
| 3. Part experimental..... | 15 |
| 3.1. <i>Reactius i equips.....</i> | <i>15</i> |
| 3.2. <i>Procediment experimental.....</i> | <i>16</i> |
| 3.2.1. Zona d'estudi i mostreig..... | 16 |
| 3.2.2. Caracterització físico-química de la mostra..... | 17 |
| 3.2.3. Preparació dels cosmes..... | 22 |
| 3.2.4. Anàlisi dels cosmes..... | 26 |
| 4. Resultats i discussió..... | 29 |
| 4.1 <i>PAH analitzats amb GC/MS.....</i> | <i>30</i> |
| 4.2 <i>OH-PAH analitzats amb GC/MS (prèvia sililació)</i> | <i>34</i> |
| 5. Conclusions..... | 37 |
| 6. Bibliografia..... | 38 |

1. INTRODUCCIÓ

El sòl és un recurs no renovable que fa de suport a l'agricultura, als assentaments humans i a la resta d'éssers vius que hi ha sobre el nostre planeta Terra. És evident que s'ha de protegir. És un sistema complex format per un conjunt de components que es vinculen entre ells amb diferents nivells de complexitat. L'eficiència amb que es relacionen aquests components, determinen la qualitat dels resultats i l'equilibri que s'obtingui entre ells farà que un sòl tingui més o menys limitacions en la seva producció.

Els hidrocarburs aromàtics policíclics (PAHs) són un grup de substàncies cancerígenes produïdes per la combustió incompleta en processos d'altres temperatures o pressions. Es poden trobar a l'aire, l'aigua o el sòl. No tenen una gran persistència al medi ambient però si que tenen una alta toxicitat. Aquests compostos es poden degradar fins a formar els seus metabòlits (OH-PAH) gràcies a l'acció dels microorganismes presents al sòl.

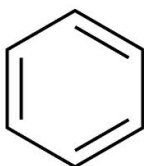
Els PAHs han estat molt estudiats i es coneixen amb diferents noms com per exemple, Hidrocarburs Aromàtics Polinuclears (PNAs), Matèria orgànica Policíclica (POM) i Hidrocarburs Polinuclears.

L'agència de protecció del medi ambient dels Estats Units (US Environmental Protection Agency) va catalogar 16 PAHs com a contaminants prioritaris. Aquesta catalogació és per fer un seguiment d'aquests compostos per tal de protegir la salut humana i el medi ambient davant d'aquests.

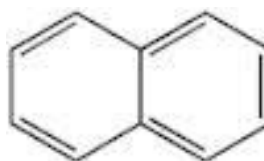
1.1 ELS HIDROCARBURS AROMÀTICS POLICÍCLICS (PAHs) I ELS METALLS PESANTS (HM):

1.1.1 Els PAHs

Els PAHs són una sèrie d'hidrocarburs anàlegs al benzè que contenen varis anells de sis membres connectats entre ells per mitjà de la compartició d'un parell d'àtoms de carboni adjacents, el que dóna lloc a anells fusionats. L'exemple més simple és el naftalè, $C_{10}H_8$:

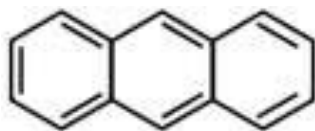


Benzè

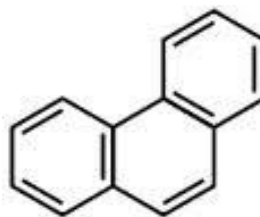


Naftalè

Conceptualment hi ha dues maneres de fusionar un tercer anell de benzè a dos àtoms de carboni al naftalè; un resulta d'una ordenació lineal dels centres ("nuclis") dels anells, mentre que l'altre és conseqüència d'una disposició "ramificada":



Antracè (disposició lineal)



Fenantrè (disposició "ramificada")

Aquests dos compostos, l'antracè i el fenantrè, són contaminants associats a la combustió incompleta, especialment de fusta i carbó, i s'emeten al medi ambient des d'abocaments, des de plantes industrials que converteixen carbó en combustible gasós, així com des de refineries de petroli.

En general, els hidrocarburs que presenten propietats similars al benzè es denominen hidrocarburs aromàtics; aquells que contenen anells de benzè fusionats s'anomenen Hidrocarburs aromàtics polinuclears (o policíclics), o abreviadament, PAHs. Igual que el benzè, molts PAHs tenen una inusual gran estabilitat i una geometria plana. Excepte el naftalè, els PAHs no s'obtenen comercialment ja que no tenen aplicacions.

Els PAHs com a contaminants:

El mecanisme de formació d'un PAH durant el procés de combustió de determinats hidrocarburs combustibles és força complex. La seva formació sembla ser deguda a la polimerització de fragments d'hidrocarburs de cadena curta que es formen durant el procés de *cracking* del petroli, és a dir que provenen primer de la ruptura en diferents parts de molècules d'hidrocarburs de cadena més llarga, i després de la polimerització d'aquests fragments. La reacció de polimerització es dona sota condicions de deficiència d'oxigen; en general, la velocitat de formació de PAH augmenta quan disminueix la relació oxigen:combustible. [6]

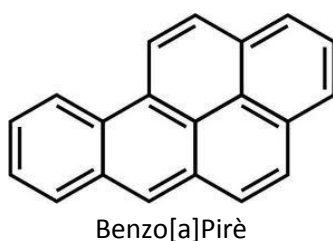
D'aquesta manera, són contaminants comuns de l'aire i estan molt implicats en la salut humana en algunes ciutats. Generalment, la concentració dels PAHs en atmosferes exteriors urbanes és de pocs nanograms per centímetre cúbic i poden arribar a multiplicar per deu aquesta quantitat en ambients molt contaminats. Cal tenir en compte que existeixen uns límits legals establerts per normativa que no s'han de superar per evitar la corresponent degradació de la nostra salut.

Els PAHs s'introdueixen al medi a partir de diferents fonts: els gasos d'escapament dels motors de combustió de la gasolina i especialment del dièsel, a partir del "quitrà" dels cigarrets, a la superfície dels aliments carbonitzats o cremats, formen part de la composició del fum de la combustió de la fusta o del carbó, així com des d'altres processos de combustió en els que el carboni del combustible no s'hagi convertit completament a CO o a CO₂. A l'aire, encara que

constitueixen només un 0,1% de les partícules atmosfèriques, preocupa la seva existència com a contaminant en aquest medi doncs entrarien als organismes vius per via respiratòria, sent molts PAHs cancerígens, tal i com s'ha corroborat en assajos previs amb animals. [6]

També són seriosos contaminants en altres medis com l'aigua. Una manera d'entrar al medi aquàtic és com a conseqüència de vessaments de petroli de tancs, refineries, així com llocs de prospecció mar endins; en aquest darrer cas cal esmentar que els PAHs més grans es bioacumulen al teixit gras d'alguns organismes marins.

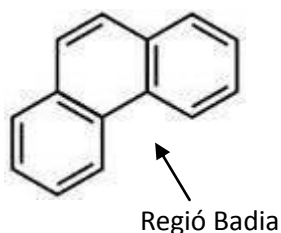
L' hidrocarbur poliaromàtic més cancerigen és el benzo[a]pirè, BaP, el qual conté cinc anells benzènics fusionats:



Aquesta molècula es denomina com un derivat del Pirè, sent el Pirè un hidrocarbur de 5 anells aromàtics. Des del punt de vista conceptual, si s'afegeix un anell de benzè a un enllaç "a" del Pirè, s'obté la molècula de Benzo[a]Pirè. El BaP és cancerigen per als animals i probablement també pels éssers humans. És preocupant perquè es s'acumula a la cadena alimentària.

Si ens preguntem si s'ha arribat a demostrar que els PAHs produeixen càncer als éssers humans la resposta no està clara. Fa uns 200 anys que se sap que l'exposició prolongada en llocs de treball a nivells alts de quitrà de carbó (que té com a principal ingredient tòxic el BaP) produeix càncer als humans. L'any 1775 es va associar el càncer d'escrot a netejadors de xemeneies amb sutge allotjat a la pell dels seus genitals. Els treballadors dels forns del coc (*coking*) i en les plantes de producció de gas experimenten un augment dels nivells de càncer de pulmó i de fetge a causa de la presència d'aquest PAH.

De tota la llista de PAHs, els que tenen propietats cancerígenes més potents posseeixen una regió anomenada Regió Badia que està formada per la ramificació en la seqüència d'anells benzènics, tal i com es mostra en el detall de la molècula següent:



El gas d'escapament dels motors dièsel, que recentment s'ha considerat com a "probable cancerígen humà", no només conté PAHs sinó que també conté altres derivats que contenen, per exemple, grups Nitro, $-NO_2$. Aquestes substàncies encara són cancerígens més actius que els PAHs. Per exemple, l'aire de Bombai, India, és de tan baixa qualitat que respirar-lo durant el dia es diu que equival, en toxicitat, a fumar deu cigarretes, i el seu aire conté compostos d'aquest tipus.

Per la majoria de no fumadors en els països desenvolupats, la major exposició als PAHs cancerígens prové de la seva dieta, en comptes de la contaminació directa de l'aire, aigua o sòl als que s'està exposat. Tal com és d'esperar, el mode de preparació del peix i de la carn fumada amb carbó vegetal, provoca que aquests aliments continguin els majors nivells de PAHs trobats en general. Les verdures com l'enciam i els espinacs també poden constituir una font de PAHs cancerígens a causa de la deposició d'aquestes substàncies provinents de l'aire sobre les fulles d'aquestes verdures (amb alta capacitat d'adsorció) durant el seu període de creixement. [6]

Els Hidroxi -PAH són els derivats dels PAH que es formen per la degradació dels PAH. Els majors productes de la hidroxilació aromàtica són els fenols, però també es poden formar catacols i quinols. Es poden formar un número variable de metabòlits hidroxilats, cosa que dependrà de les característiques particulars de cada espècie.

La hidroxilació aromàtica prové de la formació d'un epòxid com a intermediari. Per exemple, en la hidroxilació del naftalè, generalment es forma el 1-naftol com el 2-naftol (es realitza a través de la formació de l'epòxid intermedi). L'efecte carcinogen dels PAH i OH-PAH és a causa de la formació d'un epòxid intermedi. Aquesta oxidació és molt important ja que aquests metabòlits intermedis poden reaccionar amb biomolècules cel·lulars (com són alguns àcids nucleics) i produir esdeveniments mutagènics. [29]

Transport a grans distàncies de contaminants atmosfèrics:

Els compostos organoclorats i els PAHs no són volàtils però poden viatjar milers de quilòmetres per l'aire des del seu punt d'emissió i poden acabar contaminant àrees relativament prístines (primitives, originàries) del planeteta com l'Àrtic, adsorbits a partícules en suspensió. [6]

1.1.2. Els metalls pesants:

Els metalls pesats són un tipus d'elements químics, molts dels quals són coneguts compostos perjudicials per la salut dels éssers humans. El mercuri (Hg), el plom (Pb) i el cadmi (Cd) són els que presenten un major perill ambiental, a causa del seu ús extensiu, de la seva toxicitat i de la seva àmplia distribució. Els metalls difereixen dels compostos orgànics tòxics com els PAHs en que són totalment no degradables, cosa que fa que s'acumulin als sistemes ambientals, per això el seu elevat nivell de toxicitat.

Els HM es troben prop de la part inferior de la taula periòdica i per tant les seves densitats són altes en comparació amb altres materials. La major part de HM són transportats d'un lloc a l'altre a través de l'aire, com a gasos o espècies adsorbides en material particulat. [6]

Un cas d'interès, que ha estat tractat en molts casos, és la metilació del mercuri i els seus efectes ecològics. Quan apareix aquest element metàl·lic a les cadenes tròfiques es magnifica, és a dir, els seus efectes són molt intensos davant de petites quantitats de metall. Això és en part per la metilació bacteriana de l'ió mercuriós. Durant la metilació el metall es fa més volàtil i el procés es podria dir que és una desintoxicació de la matèria viva.

El mercuri (Hg): la toxicitat mediambiental del mercuri s'associa quasi exclusivament amb el consum de peix; aquesta font representa el 94% de la exposició humana al mercuri. Les bactèries reductores de sulfat, presents als sediments, generen metil mercuri i l'eliminen de les aigües on és absorbit pels peixos. A causa de l'elevada afinitat del mercuri pels grups sulfhidrilo, l'eliminació del mercuri és molt lenta i per tant es bioacumula quan el peix gran es menja al petit. Aquest metall s'acumula preferentment a les proteïnes dels teixits (músculs) més que al greix. El mercuri està present a tots els peixos independentment del seu origen. Els nivells s'eleven en aquells cossos d'aigua en els quals els sediments estan contaminats de mercuri a causa d'abocaments de residus contaminats. El cicle natural del mercuri pot alterar-se per les activitats humanes. S'han detectat alts nivells de mercuri en peixos de preses hidroelèctriques de Quebec i Manitoba (Canadà). L'origen d'aquesta "contaminació" va ser l'acció de les bactèries sobre el mercuri present amb anterioritat als sòls inundats.

El Plom (Pb): de totes les substàncies tòxiques presents al medi ambient, el plom és el més persistent; origina anualment milers d'enverinaments, especialment en nens d'àrees urbanes. Les plantes no acumulen plom, però es un contaminant habitual dels aliments a causa de la seva abundant presència de partícules de pols, les quals es poden dipositar sobre els conreus o durant el processat dels aliments. La major amenaça per la salut pública és el plom que s'allibera a l'atmosfera a través dels gasos d'escapament dels cotxes. Els additius de plom van ser eliminats de les gasolines als Estats Units a l'inici dels anys setanta, quan es van introduir els catalitzadors catalítics per al control de la contaminació ja que les partícules de plom dels gasos d'escapament desactiven la superfície dels catalitzadors. Les intoxicacions amb plom vénen de l'antiguitat. Van ser els grecs que van associar l'aparició de la malaltia amb el consum de begudes emmagatzemades en recipients de plom. Els romans no se'n van adonar i afegien deliberadament sals de plom als vins àcids per tal d'extreure'n un gust dolç. Els ossos dels romans presenten concentracions de plom més elevades que les dels pobladors actuals.

El Cadmi (Cd): el cadmi sempre apareix associat a l'escorça terrestre amb el zinc i s'obté com a subproducte a la mineria i extracció de zinc; no existeixen mines de cadmi separades del zinc. Una de les fonts urbanes de cadmi es l'acer tractat amb zinc (acer galvanitzat). L'erosió de les superfícies d'acer galvanitzat produeix una pols urbana que conté zinc i cadmi. La majoria de cadmi que ingerim procedeix dels vegetals, el cadmi és acumulat de forma activa per les plantes ja que el zinc és un nutrient essencial per elles. Les persones fumadores inhalen una dosi extra de cadmi ja que aquest metall es concentra en les fulles de tabac.

Una causa de preocupació relacionada amb el cadmi és la possible acumulació a terrenys agrícoles que pot originar elevats nivells de cadmi als aliments. El Cd present als sòls procedeix de la deposició de partícules i de l'aplicació de fertilitzants comercials de fosfat on el cadmi es troba present per ser un constituent natural dels minerals de fosfat. Els temps de residència del Cd al sòl són uns quants ordres de magnitud superior a la seva vida a l'aire o a l'aigua, particularment quan el pH del sòl és superior a 6,0, situació habitual en els sòls agrícoles a causa de l'addició de cal (CaCO_3). La exposició crònica al cadmi s'ha relacionat amb l'aparició de malalties coronaries i pulmonars (incloent el càncer de pulmó), supressió del sistema immunològic i malalties de ronyó i fetge. [7]

1.2 TÈCNIQUES D'EXTRACCIÓ -SEPARACIÓ

Definició extracció: procés de transferència de matèria entre dues fases immiscibles, que permet la separació de mescles sòlides, líquides o dissoltes mitjançant el seu tractament amb un solvent. [2]

Principi d'extracció: separació d'una substància d'una barreja mitjançant un dissolvent. El factor clau és la diferència de concentració de la substància entre la barreja i el dissolvent, així com la diferent afinitat de la substància pel dissolvent respecte la resta de components de la barreja.

En un sentit ampli, l'extracció és una tècnica de separació que permet obtenir en un estat més o menys pur una substància que inicialment es troba en una mostra complexa. La tècnica es basa en les diferències de solvatació de les substàncies en ambdues fases. Generalment l'extracció es realitza entre dues fases líquides immiscibles (aigua i algun dissolvent orgànic, com per exemple cloroform) i aleshores la tècnica s'anomena extracció líquid – líquid; quan una de les fases és sòlida s'anomena extracció líquid – sòlid. [4]

Definició solvatació: interacció de solvents polars amb ions o molècules de solut mitjançant forces atractives ió- dipol o dipol- dipol. [2]

1.2.1. Cromatografia:

La cromatografia és una tècnica amb la qual els components d'una barreja, es separen segons les diferents velocitats amb les que es desplacen a través d'una fase estacionària quan són transportats per una fase mòbil, que pot ser líquida o gasosa.

Classificació dels mètodes cromatogràfics

Els mètodes cromatogràfics són de dos tipus, cromatografia en columna i cromatografia plana. A la cromatografia en columna, la fase estacionària està retinguda en un tub estret, i la fase mòbil es fa passar a través del tub sota pressió o per gravetat. En la cromatografia plana, la

fase estacionaria està immòbil sobre una placa plana o als porus d'un paper. En aquest cas la fase mòbil es mou a través de la fase estacionaria per acció capil·lar o per efecte de la gravetat. La separació per mètodes cromatogràfics es basa en la diferent afinitat dels compostos d'una mostra per la fase mòbil i per la fase estacionària, de manera que els compostos més retinguts són aquells que tenen més afinitat per la fase estacionària i per això surten més tard al final de la columna.

Cromatograma

Si a la sortida de la columna es col·loca un detector que respon a la concentració del solut i es registra la seva resposta en funció del temps (o del volum de fase mòbil que ha passat), s'obtenen una sèrie de pics simètrics, com es mostra a la figura 1. El que es veu és una representació d'alguna funció de la concentració del solut en funció del temps d'elució o del volum d'elució. Aquest gràfic s'anomena cromatograma i és útil per anàlisis qualitius i quantitatius. Les posicions dels pics amb l'eix del temps es poden utilitzar per identificar els components de la mostra, segons la seva afinitat amb la fase estacionària, de manera que els primers pics corresponen als compostos menys afins a la fase estacionaria i més afins a la fase mòbil; les àrees dels pics aporten una mesura quantitativa de la quantitat de cada espècie, doncs l'àrea es relaciona amb el senyal del detector, el qual està relacionat amb la quantitat de compost.

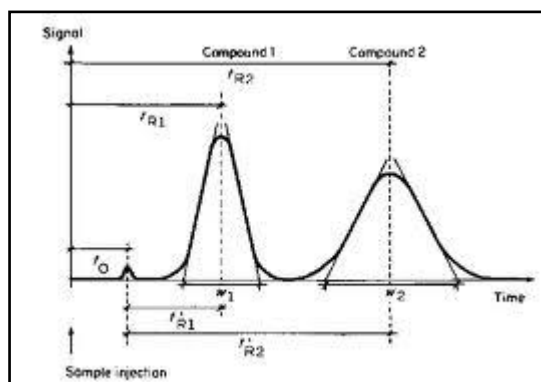


Figura 1: Cromatograma: temps de retenció, pic de l'aire i pics de les mostres. Font: [33]

Sistemes cromatogràfics

La classificació dels sistemes cromatogràfics es pot dur a terme segons diverses característiques, de les quals, el tipus de fase mòbil és probablement la més important. Aquesta pot ser un gas o un líquid i, per tant, la cromatografia es pot classificar en cromatografia de gasos o cromatografia de líquids, respectivament [4]. La cromatografia de fluids supercrítics és un híbrid de la cromatografia de gasos i la cromatografia de líquids que reuneix els avantatges de les dues. La cromatografia plana i la de columna estan basades en els mateixos tipus d'equilibris. La cromatografia de líquids es pot realitzar en columnes o en superfícies planes, però la cromatografia de gasos i la de fluids supercrítics només es poden realitzar en columna. [5]

* Cromatografia de líquids (HPLC): la principal dificultat en emprar un líquid és la seva viscositat si es compara amb la d'un gas, així, per aconseguir vèncer la resistència de la columna cromatogràfica al pas del líquid calen pressions d'uns 10MPa (unes 100 atmosferes). L'eficàcia de les columnes és elevada i d'aquí prové el nom de la tècnica: cromatografia de líquids d'alta eficàcia o resolució (HPLC). Actualment s'empren molts tipus diferents de rebliments.

Un cromatògraf de líquids HPLC, consta d'un recipient per la fase mòbil, la qual s'introdueix a la columna emprant una bomba d'alta pressió (aquesta es controla mitjançant un manòmetre i una vàlvula de seguretat). D'altra banda hi ha la vàlvula d'injecció o injector que permet introduir la mostra a la columna, on tindrà lloc la distinció -separació dels diferents compostos presents a la mostra. Aquesta columna consta d'un rebliment adequat per tal de mostrar afinitats diferents pels compostos de la mostra. Així, la fase mòbil i les substàncies eluïdes per aquesta passen a través de la columna primer i després pel detector. Aquest recull el senyal en funció del temps i l'envia a un enregistrator, integrador o ordinador. [4]

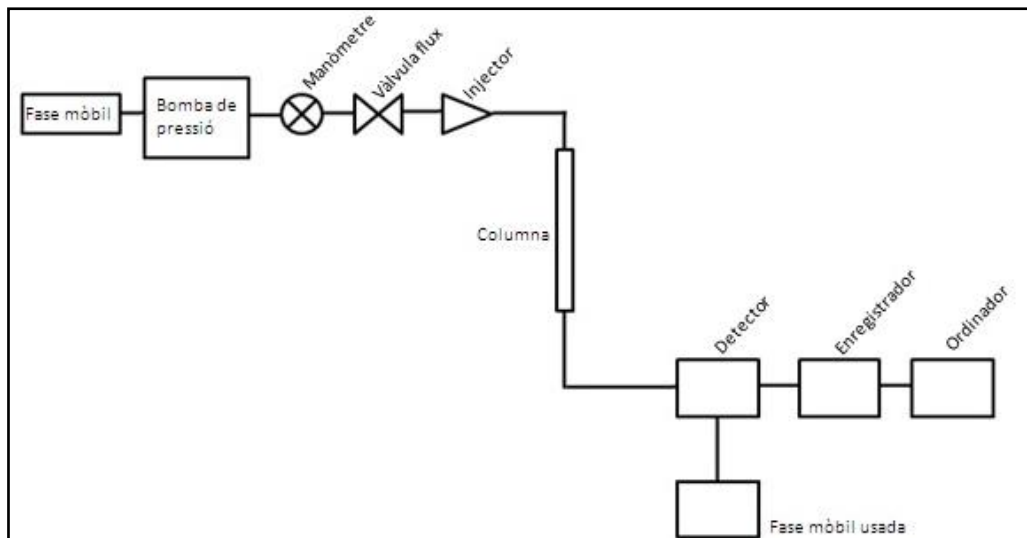


Figura 2: Esquema d'un cromatògraf de líquids (HPLC). Font: Elaboració pròpia

Definició de Cromatografia de líquids d'alta resolució (HPLC): cromatografia de líquids en què s'utilitzen columnes reblertes de partícules molt fines ben empaquetades amb un dispositiu d'alta pressió que facilita la circulació del solvent dins la columna cromatogràfica. [2]

* Cromatografia de gasos (GC): en cromatografia de gasos la fase mòbil és un gas inert com l'heli, l'argó o el nitrogen. La fase estacionària és normalment una fase líquida (per exemple un hidrocarbur d'elevat pes molecular) que es col·loca sobre un suport porós inert. Permet analitzar nombrosos compostos, com per exemple hidrocarburs. També es poden analitzar compostos no volàtils si s'obtenen derivats amb certa volatilitat.

Un cromatògraf de gasos (GC) consta de la fase mòbil, un gas, el qual es troba en una bombona a alta pressió i es connecta al instrument mitjançant un reductor de pressió. Normalment el gas passa per un filtre per purificar-lo, després per un manòmetre que controla la pressió i, finalment, entra a l'injector. L'injector és la part per on s'introdueix la mostra a la columna, i es manté a temperatura elevada ja que la mostra líquida introduïda amb una

xeringa s'ha de vaporitzar per tal que els compostos de la mostra estiguin en estat gasós. La columna, que està connectada directament a l'injector, està col·locada en un forn termòstatitzat que manté la temperatura òptima per a la separació dels compostos de la mostra. Així, quan la mostra entra a la columna, la fase mòbil gas l'arrossega de tal manera que afectarà la interacció dels compostos amb la fase estacionària de la columna, i també pot afectar la temperatura del forn, que pot variar i així fem variar la volatilitat dels compostos. Les substàncies separades a la columna entren al detector, el senyal del qual s'amplifica i s'enregistra.

Avui dia tant els cromatògrafs de gasos com els de líquids poden portar un convertidor analògic digital que permet enviar la informació a un ordinador per al seu tractament. [4]

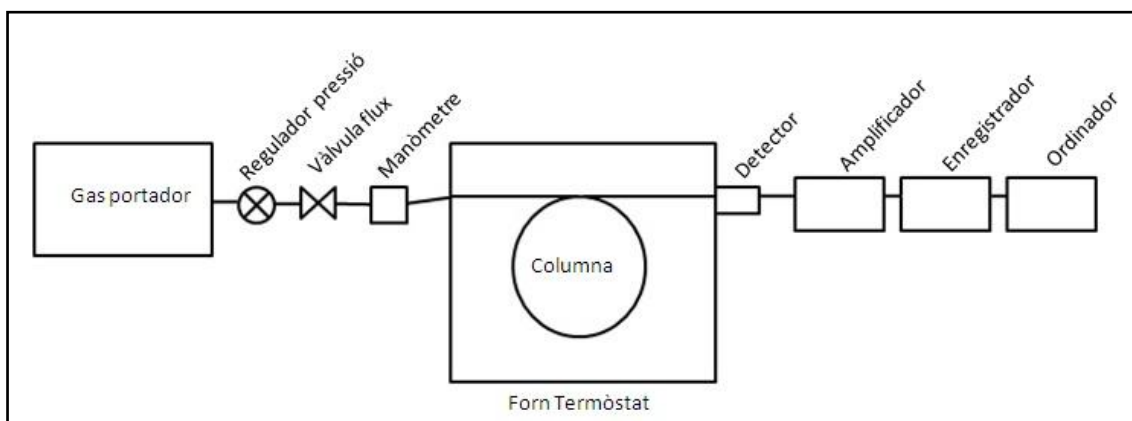


Figura 3: Esquema cromatògraf de gasos. Font: Elaboració pròpia

Definició de Cromatografia de gasos: cromatografia en què la fase mòbil és un gas, i els compostos de la mostra han de tenir una certa volatilitat per poder ser injectats en estat gasós i poder aprofitar aquesta diferent volatilitat variant la temperatura de la columna, i així aconseguir la separació desitjada al final de la mateixa.[2]

A la taula següent es poden veure les diferències entre la cromatografia de gasos i la cromatografia de líquids.

| | |
|--|--|
| Característiques de les dues: <ul style="list-style-type: none"> - Eficients, molt selectives i molt utilitzades - Requereixen molt poca mostra - Es poden utilitzar sense destruir la mostra - Són fàcilment adaptables a anàlisis quantitatives | Avantatges de GC: <ul style="list-style-type: none"> -Equip senzill i econòmic -Ràpida -Resolució no igualable (amb columnes capil·lars) - És fàcil d'acoblar amb l'espectroscòpia de masses. |
| | Avantatges de l'HPLC: <ul style="list-style-type: none"> - Es pot aplicar a mostres tèrmicament inestables i no volàtils - En general són aplicables a ions inorgànics |

Figura 4: Comparació entre la cromatografia HPLC i GC. Font:[5]

* Cromatografia de fluids supercrítics (SFC): Com ja s'ha comentat abans, la cromatografia de fluids supercrítics és un híbrid entre els dos tipus més usuals de cromatografia (de gasos i de líquids). Un fluid supercrític es forma sempre que una substància s'escalfa per sobre de la seva temperatura crítica. A aquesta temperatura, ja no es pot condensar a estat líquid per l'augment de pressió. Una propietat important dels fluids supercrítics és la seva capacitat per dissoldre grans molècules no volàtils.

Definició de Cromatografia de fluids supercrítics (SFC): cromatografia de gasos que es duu a terme a pressions altes i a temperatures superiors a la temperatura crítica del gas portador. [2]

Les tècniques cromatogràfiques s'han desenvolupat fins a tal punt que s'han convertit en els mètodes més importants de separació d'espècies químiques relacionades entre si. Així, es poden utilitzar per la identificació qualitativa així com per la determinació quantitativa de les espècies que separa. És una tècnica molt general per reconèixer la presència o absència de components en una mostra complexa. D'altra banda, s'ha convertit en una pràctica comuna acoblar els sistemes de columnes cromatogràfiques a sistemes de detecció diversos, tan espectrometria ultraviolada, d'infraroig o de masses. Els instruments acoblats resulten ser potents tècniques d'identificació dels components d'una barreja complexa. Entre les tècniques acoblades es poden citar: la cromatografia de gasos acoblada a l'espectrometria de masses (GC-MS), la cromatografia de líquids d'alta resolució acoblada també a l'espectrometria de masses (HPLC-MS) i la cromatografia de gasos amb detecció infraroja (GC-IR), entre d'altres. És important veure que encara que un cromatograma a vegades no permet la identificació positiva d'una espècie en una mostra, si que pot proporcionar una evidència segura de la seva absència.

1.2.2. Extracció assistida per microones (MAE)

L'extracció assistida per microones proporciona tècniques selectives i ràpides en les que s'obtenen recuperacions millors o similars a les obtingudes amb els processos d'extracció convencionals. Ofereix certs avantatges sobre altres tecnologies d'extracció, com són un menor consum d'energia, menors volums de dissolvents, menor toxicitat dels dissolvents usats (ocasionalment) i, en general, menor quantitat de residus, pel qual es pot parlar de "*tècniques netes*".

La MAE es basa en l'ús de l'energia de les microones per aconseguir que els compostos d'interès passin de la mostra (normalment sòlida) a un dissolvent. L'extracció es duu a terme en recipients transparents a aquesta radiació que poden ser oberts o tancats. Generalment són recipients tancats, doncs es treballa sota pressió per afavorir el procés d'extracció. S'aplica l'energia de les microones amb un dissolvent adequat, de manera que s'escalfen les espècies químiques, i es produeix la seva extracció cap a la fase dissolvent de forma ràpida, i amb una certa selectivitat. L'escalfament produït depèn de la naturalesa química de la matriu i del

dissolvent. La mostra s'escalfa a temperatures molt superiors al seu punt d'ebullició durant un temps molt curt (de manera que augmenta la pressió en el sistema tancat). Un cop finalitzat el procés d'extracció, es deixa refredar i a continuació es filtra l'extracte. Un cop extrets els analits amb el solvent adequat, es pot procedir a l'anàlisi d'aquests mitjançant la cromatografia de gasos o el cromatògraf de líquids, que són els mètodes instrumentals utilitzats en aquest treball.

Components bàsics de l'equip microones

Tots els sistemes de microones consten de dos components principals: el generador de microones i l'aplicador d'aquestes. La connexió entre els dos components es fa a partir de la guia d'ones [8]. D'altra banda tenim el vas d'extracció i el carro on hi van instal·lats un nombre determinats de vasos dins de l'equip de microones analítica.

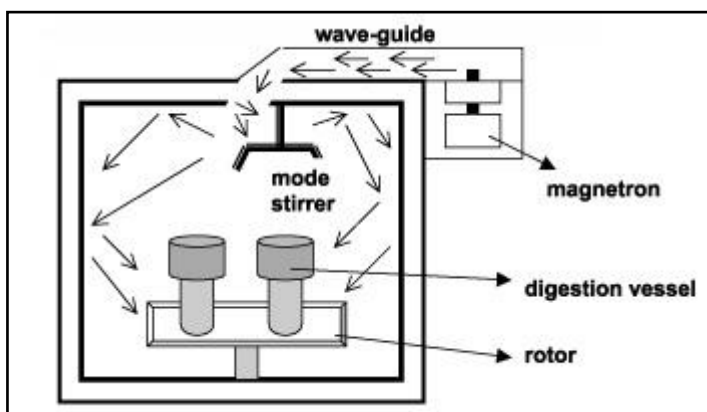


Figura 5: Esquema microones. Font: [12]



Figura 6: Microones Mars 5.CEM.
Font: Elaboració pròpia

Vasos d'extracció: el microones utilitza vasos de tefló segellats amb una tapa també de tefló, de tal manera que la mostra i el dissolvent estan en contacte només amb el material inert. Com que els vasos estan pressuritzats durant el procés d'extracció, cadascun d'ells porta una membrana de seguretat per tal de detectar qualsevol sobrepressió que hi pugui haver durant el procés.

S'empra un vas de control al qual se li ha modificat la coberta per poder portar a terme el control intern de la pressió i la temperatura. Aquestes condicions de seguretat dels sistemes de microones estan encaminades a prevenir la ignició

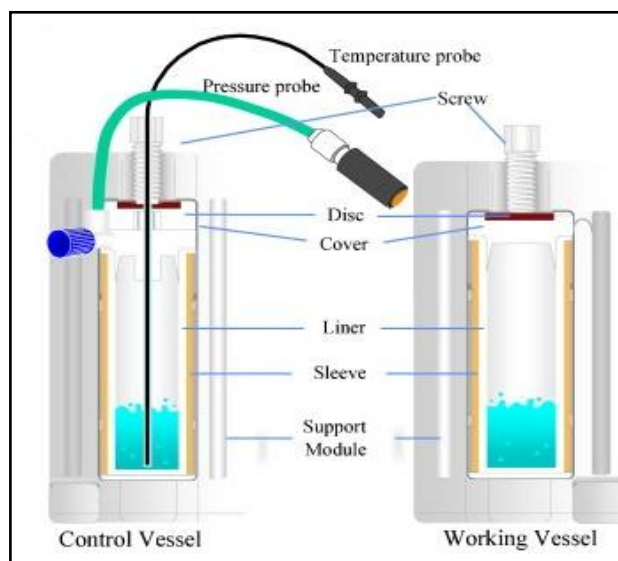


Figura 7: Esquema vas microones. Font: [32]

dels dissolvents orgànics, potencialment inflamables i explosius, empleats durant el procés d'extracció. Quan s'escalfa un dissolvent orgànic polar o una barreja de dissolvents en un sistema tancat a una temperatura superior al seu punt d'ebullició i és sotmès a una pressió que excedeix de 100psi, la possibilitat de patir un accident s'incrementa enormement.

A la següent taula es poden veure els avantatges i inconvenients de l'extracció assistida amb microones:

| Característiques del MAE (i avantatges) | Limitacions a destacar del MAE: |
|---|--|
| <p>Tècnica ràpida (20-30min).</p> <p>Utilitza poc dissolvent: 20-40ml. Soxhlet: 300-500ml.</p> <p>Permet el control dels paràmetres d'extracció: temps, potència i temperatura.</p> <p>Permet treballar a altes temperatures.</p> <p>No fa falta deshidratar o processar la mostra.</p> <p>L'energia està localitzada i s'aprofita millor (menys consum).</p> <p>Es poden processar fins a 12 mostres alhora.</p> | <p>Els extractes han de ser filtrats abans de la seva mesura.</p> <p>L'extracció és selectiva, però amb freqüència és necessària alguna etapa addicional de purificació.</p> <p>Degradació de compostos tèrmicament làbils.</p> <p>El cost dels equips d'extracció és relativament elevat.</p> |

Figura 8: Taula amb característiques del MAE .Avantatges i inconvenients. Font: [8]

1.2.3. Concentració amb evaporador rotatori

Un evaporador rotatori, és un dispositiu que s'utilitza en laboratoris de química per la eliminació eficient i suau de dissolvents en substàncies a través de l'evaporació. Aplicacions típiques que es poden dur a terme amb els evaporadors rotatoris són [23]:

- Concentracions
- Recristal·litzacions
- Assecat
- Tractament final de dissolvents (neteja)
- Extracció de productes

1.2.4. Sililació amb bany de silicona

Definició sililació: procés de substitució d'un protó actiu en una molècula d'un compost orgànic pel grup silil H_3Si - o algun dels seus derivats.[2]

La sililació ha trobat una gran aplicació en anàlisi química pel fet que els composts sililats gaudeixen d'una volatilitat molt més gran i d'una polaritat molt més petita que els compostos corresponents no sililats, la qual cosa ha facilitat el seu estudi i separació a partir de les tècniques cromatogràfiques habituals. És molt fàcil de fer i els compostos sililats gaudeixen

d'una total estabilitat en medi bàsic no aquós, així com d'una gran facilitat per regenerar els grups funcionals originals.

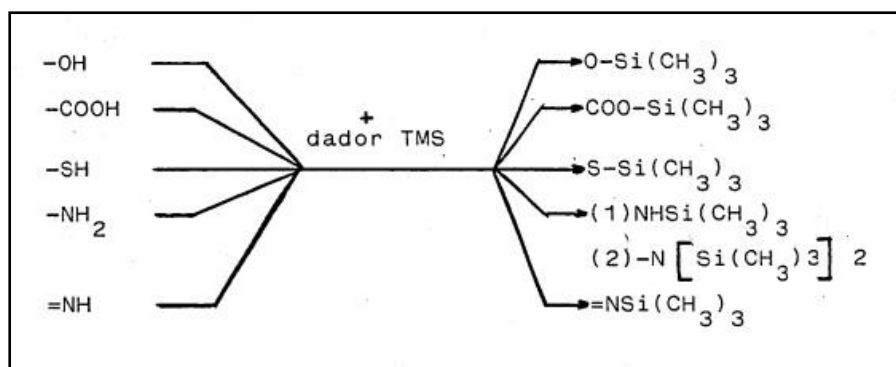


Figura 9: Esquema procés de sililació. Font:[25]

Per fer el procés de sililació amb bany de silicona, s'usa un reactiu, el BSTFA (N, O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida), molt útil per grups no excessivament reactius. S'introdueix juntament amb la mostra a sililar i es posen al bany de silicona durant 30 minuts. [25]

2. OBJECTIUS

Els objectius marcats en aquest estudi són els següents:

- Observar la degradació dels PAHs, en presència o absència de metalls pesants al sòl de la C-58, per l'acció dels microorganismes presents al sòl . Realitzar les anàlisis mitjançant l'extracció assistida per microones i l'anàlisi per cromatografia de gasos acoblada a l'espectrometria de masses, en absència i en presència de metalls pesants.

- Observar l'aparició d'alguns metabòlits monohidroxilats (OH-PAH) dels PAHs com a productes de la degradació d'aquests, tot seguint també l'extracció assistida per microones i el posterior anàlisi dels OH-PAHs seguint el corresponent mètode per GC-MS., l'extracció amb microones i la següent sililació. Anàlisi per cromatografia de gasos acoblada a l'espectrometria de masses .

Hi ha un altre part d'objectius, més personals, de coneixement propi:

- Conèixer i veure a la pràctica com funcionen les tècniques de separació, més enllà de la teoria, així com diverses tècniques instrumentals.

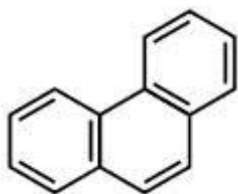
- Veure i participar directament en tot el procés de la caracterització i estudi de mostres de sòl contaminades, des de la presa de la mostra, el seu pretractament i l'anàlisi del seu contingut.

- Saber com funciona un laboratori i aprendre a treballar-hi.

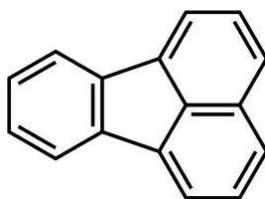
3. PART EXPERIMENTAL

3.1. REACTIUS I EQUIPS

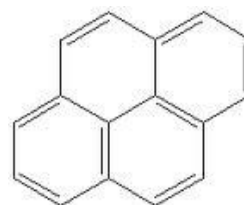
Els PAHs que s'estudiaran són 5 dels 16 que la US EPA considera com a contaminants prioritaris. Aquests 5 són els següents: *Phenanthrene (Phe)*, *Fluoranthene (Fluo)*, *Pyrene (Pyr)*, *Benzo[a]pyrene (BaP)* i *Benzo[b]fluoranthene (BbF)*. S'han adquirit els patrons sòlids a Sigma Aldrich, Madrid (Espanya). Configuracions dels PAH estudiats amb el pes molecular de cada un entre parèntesis.



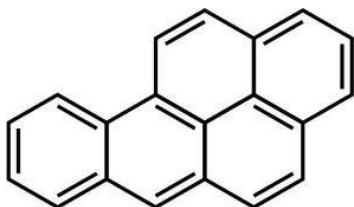
Phenanthrene (178,2)



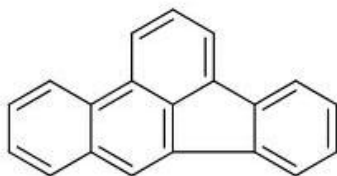
Fluoranthene (202,3)



Pyrene (202,3)



Benzo(a)pyrene (252,3)



Benzo (b)fluoranthene (252,3)

Com a patró intern es va comprar el *Phenanthrene d-10* també a Sigma Aldrich, Madrid (Espanya). A partir d'aquest patró intern es preparen els patrons de calibratge explicats a la pàgina 26.

Els dissolvents emprats són: acetona, aigua milliQ, aigua destil·lada, acetonitril, toluè, Clorur de Potassi 0'1M (KCl) i àcid clorhídric (HCl), també adquirits a Sigma Aldrich, Madrid (Espanya).

Els equips utilitzat són:

Balança de precisió, SCALTEC SBC 21

Mufla CARBOLITE

Estufa Memmert UM400

Estufa GALEN CAMP. Economy Incubator

pH-metre CRISON. MicroPH 2000

Molturador RETSCH

Microones MARX 5. CEM

Cromatògraf de gasos acoblat a espectrometria de masses de Thermo Fischer Scientific

Rotavapor Büchi 461 R-111

Escalfador OVAN

Conductímetre CRISON microCM 2200

3.2. PROCEDIMENT EXPERIMENTAL

3.2.1. Zona d'estudi i mostreig:

El present estudi està localitzat a la carretera C-58, també anomenada autopista del Vallès. Aquesta carretera uneix Barcelona amb Terrassa i és un dels eixos viaris més transitats de Catalunya, atesa la densitat demogràfica i econòmica de les poblacions per les quals discorre aquesta via. Amb els seus 39 km de longitud passa per nuclis importants com Montcada i Reixac, Cerdanyola del Vallès o Sabadell. En concret es va anar a fer la presa de mostres prop del quilòmetre 16, un cop passat Sabadell i just abans d'arribar a Terrassa. En el següent mapa es pot veure més exactament on es va dur a terme la presa de mostres.

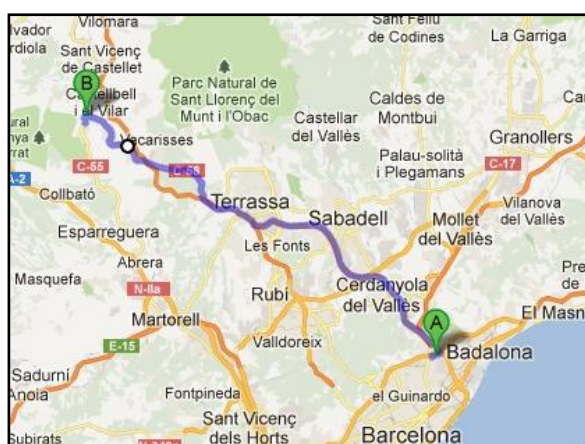


Figura 10: Recorregut de l'autopista C-58
Font: Elaboració pròpia



Figura 11: Punt de mostreig a la C-58
Font: Elaboració pròpia

Es mostregen 5 punts amb una separació d'1 m entre ells. Per tan, s'agafen 5 submostres per tal d'aconseguir una mostra representativa de l'àrea d'estudi. A cada punt, amb l'ajuda de la pala i l'aixada es fa un forat al terra, de 15 cm de profunditat i 20 cm de costat (veure la Figura 12). La quantitat total de mostra presa ha de ser suficient per poder fer els assajos posteriors, de manera que amb un 1 kg per punt/forat n'hi ha suficient, tot i que un cop al camp es comprova que tant sols una palada ja corresponen a 3 o 4 kg. En total doncs es van agafar uns 20 kg de sòl. Es treuen les herbes i plantes que hi puguin haver a la superfície i es posa tot dins d'una bossa. Es tapen els forats per tal de no causar accidents i deixar la zona tal com estava.

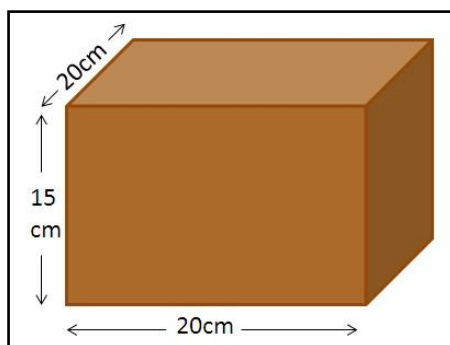


Figura 12: Model del tipus de mostreig escollit. Font: Elaboració pròpia

(Per fer aquesta presa de mostres no es necessita cap permís especial. El departament de carreteres de la Generalitat de Catalunya va dir que si no s'obstaculitza el trànsit no hi ha cap problema.)

3.2.2. Caracterització físico-química de la mostra

Per tal de saber com és la nostra mostra i determinar-ne les seves propietats, es fan un seguit de proves, determinant-ne la humitat, l'acidesa, la conductivitat i el seu contingut en carbonats.

Humitat

Els primers passos per caracteritzar físico - químicament al sòl és determinar la humitat de la mostra. La humitat dels sòl influeix en moltes propietats físiques, com per exemple la densitat aparent, l'espai aeri, la compactació o el color del sòl. També influeix en alguns processos químics i bioquímics del sòl i en l'activitat microbial.

* Materials i reactius: balança, espàtula, mostra de sòl, estufa, dessecador, 5 pots de vidre. No és necessari cap tipus de reactiu.

* Procediment: es pesen entre 1 i 3 grams de mostra per cada rèplica (un total de 5 rèpliques). S'apunta quin pes exacte s'ha pesat de cada una. Es posen a l'estufa a 115°C durant una nit. Un cop passades 12 hores (aproximadament), es retiren els vasos de precipitats i es

pesen. Per saber exactament el pes de sòl sec que queda després de l'estufa es deixa refredar al dessecador (per evitar que les mostres agafin humitat). És necessari pesar els vasos un cop buits, nets i secs per tal de poder fer la diferència pes. A la taula es mostren els resultats finals i el càlcul d'humitat fet amb la següent fórmula:

$$\text{Humitat (\%)} = \frac{\text{pes sòl humit} - \text{pes sòl sec}}{\text{pes sòl sec}} \times 100$$

* Resultats:

| Rèplica | Pes abans | Pes sòl sec | %Humitat |
|---------|-----------|-------------|----------|
| A | 2,5643 | 2,5643 | 6,80 |
| B | 2,6290 | 2,6290 | 6,78 |
| C | 2,6604 | 2,6604 | 6,76 |
| D | 2,5797 | 2,5797 | 6,71 |
| E | 2,4725 | 2,4725 | 6,71 |

Figura 13: Resultats de l'anàlisi de la humitat. Font: Elaboració pròpia

* Discussió: la humitat del sòl és un paràmetre dinàmic, variable, que depèn de diferents factors com són el clima, la vegetació, la profunditat del sòl, així com el perfil d'aquest. A la mostra de sòl d'estudi hi ha una humitat mitjana de 6,75%. És un sòl força sec, típic d'aquesta zona del mediterrani.

pH: acidesa potencial i acidesa activa

El pH és una propietat química essencial als sòls, que determina el comportament d'aquests, l'evolució dels components químics presents, així com l'evolució dels corresponents éssers vius representats bàsicament per la vegetació i, en menor mesura, per la fauna edàfica. És necessari distingir entre acidesa activa i acidesa potencial:

- L'acidesa activa o real: expressa l'activitat dels protons a la fase líquida del sòl, per tant, és un valor molt pròxim al del pH al qual estan exposades les arrels de les plantes al sòl.

- L'acidesa potencial o intercanviable serveix per estimar els efectes pràctics de la utilització de fertilitzants al sòl. En aquest cas la mesura s'efectua tot emprant una solució salina enlloc d'aigua pura, de forma que el pH tendeix a disminuir a mesura que el contingut en sals de la solució aquosa augmenta. Això és a causa del desplaçament dels H^+ i Al^{3+} de les superfícies carregades del sòl per part dels ions de la sal. Mitjançant aquest paràmetre es poden classificar els sòls en funció del pH.

* Materials i reactius: Tubs de plàstic amb tap (10), aigua milliQ, balança, mostra de sòl, KCl 0,1M, espàtula, pipeta, pipetejador, agitador, pH-metre.

| pH | Acidesa potencial | Característiques |
|---------|---------------------------|---|
| 2,0-4,0 | Sòls amb acidesa extrema | Oxidació de sulfurs a àcid sulfúric |
| 4,0-5,5 | Sòls molt àcids | Alumini lliure |
| 5,5-6,5 | Sòls amb acidesa moderada | Àcids orgànics, climes humits |
| 6,5-7,5 | Sòls neutres | Complex de canvi quasi saturat |
| 7,5-8,5 | Sòls carbonatats | Domini de Ca^{2+} i Mg^{2+} |
| 8,5-9,5 | Sòls sòdics | Domini de Na^+ |

Figura 14: Característiques dels sòls en funció de la seva acidesa potencial d'un sòl segons el seu pH. Font: [15]

* **Procediment:** La determinació de l'acidesa activa s'efectua mitjançant la mesura directa del pH d'una barreja 1:2,5 sòl:aigua que ha sigut agitada durant 30 minuts. Per la mesura de l'acidesa potencial es fa una barreja de sòl:KCl 0,1 M 1:2,5 agitada també durant 30 minuts. Fem 5 replicats per cada cas. Amb l'ajuda de la balança i de l'espàtula es pesa aproximadament 1 g de mostra per rèplica i es posa dins del tub. Als 5 primers tubs (acidesa activa) s'afegeix 2,5 ml d'aigua milliQ. Als 5 tubs restants, per determinar l'acidesa potencial, s'afegeix 2,5 ml de KCl 0,1 M. Es posen a l'agitador durant 30 minuts. Un cop passat el temps es retiren i es mesura el pH amb l'ajuda del pH-metre prèviament calibrat.

* **Resultats:**

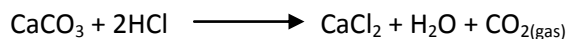
| | Rèplica | Pes (g) | pH |
|--------------------------|---------|---------|------|
| Acidesa Activa | A | 1,08904 | 7,57 |
| | B | 1,17366 | 8,11 |
| | C | 0,99624 | 8,15 |
| | D | 1,01042 | 8,18 |
| | E | 1,01866 | 8,13 |
| Acidesa Potencial | F | 1,14730 | 7,14 |
| | G | 1,00965 | 7,26 |
| | H | 1,00066 | 7,22 |
| | I | 0,99704 | 7,25 |
| | J | 1,03017 | 7,25 |

Figura 15: Resultats de l'anàlisi de l'acidesa. Font: Elaboració pròpia

* **Observacions/conclusions:** Es troba una mitjana d'acidesa activa de 8,03 i una mitjana d'acidesa potencial de 7,22. Per tant, i segons la figura 14 podem dir que el sòl és un sòl probablement carbonatat, amb domini de Ca^{2+} i Mg^{2+} en la seva composició, doncs és un sòl més aviat bàsic. Als sòls bàsics o salins existeixen sals amb una proporció suficient com per augmentar la pressió osmòtica de la solució del sòl i dificultar d'aquesta forma l'absorció d'aigua per als vegetals. Aquests sòls acostumen a ser pobres en matèria orgànica i en vegetació, que fa limitar el creixement d'algunes espècies halòfites (organismes adaptats a viure en medis salins) i són molt sensibles a l'erosió. En termes d'acidesa potencial, és molt difícil conrear un sòl per sota de 5 i per damunt de 8,5.

Carbonats

La mesura del percentatge de CaCO_3 en un sòl es fonamenta en la determinació gasomètrica de CO_2 . En atacar una quantitat de mostra amb un volum d' HCl , es produeix un volum de CO_2 , d'acord amb la reacció:



Es mesura el volum de CO_2 després i, mitjançant l'equació dels gasos ideals ($PV=nRT$), es pot determinar la quantitat de carbonats a la mostra.

* Procediment: Amb l'ajuda de la balança i l'espàtula es pesa aproximadament 0,5 g de mostra i es posen a un baló de fons rodó de tres boques. Es col·loca el baló tal com es veu a la figura 19. Amb l'ajuda de la bureta sabem quina quantitat ha deixat anar i per tant, mitjançant càlculs, podrem saber la quantitat de carbonats de la mostra.

* Resultats:

| Rèplica | Pes (g) | Volum CO_2 (ml) | g CaCO_3 | % CO_3^{2-} |
|---------|---------|--------------------------|-------------------|----------------------|
| A | 0,5112 | 16,9 | 0,0696 | 13,61 |
| B | 0,5428 | 9,3 | 0,0383 | 7,06 |
| C | 0,5806 | 10,2 | 0,0420 | 7,23 |
| D | 0,5067 | 11,2 | 0,0461 | 9,10 |
| E | 0,5049 | 10,4 | 0,0428 | 8,48 |

Figura 16: Resultats de l'anàlisi de carbonats. Font:Elaboració pròpia

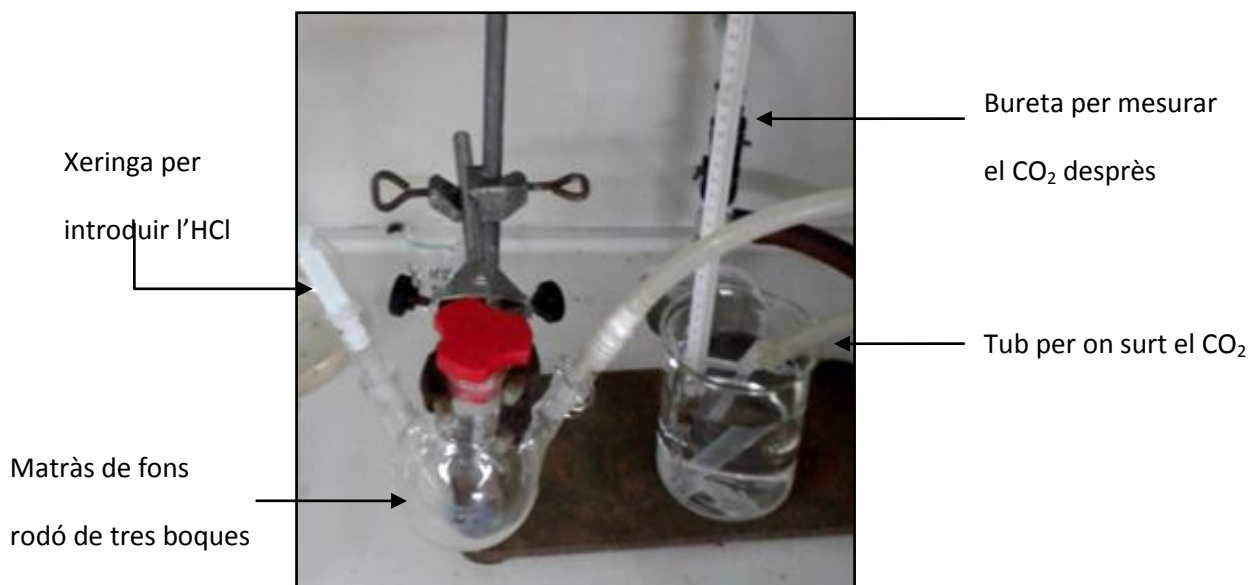


Figura 17: Fotografia on es veu com posar els instruments per l'anàlisi de carbonats.

Font: Elaboració pròpia

* Discussió: prescindint dels resultats de la rèplica A ja que té un valor fora del normal, s'observa una mitjana de 7,97% de carbonats a la mostra. Segons la figura 18 podem veure que és un valor qualificat com a baix

| Carbonats (%) | Qualificació |
|---------------|--------------|
| <5 | Molt baix |
| 5-10 | Baix |
| 10-20 | Normal |
| 20-40 | Alt |
| >40 | Molta alt |

Figura 18: Qualificació del sòl segons el percentatge de carbonats. Font: [10]

Conductivitat

La resistència elèctrica de les solucions disminueix quan augmenta el contingut de sals solubles, i per tant la conductància augmenta. Coneixent la dependència existent entre la conductivitat i la temperatura, les mesures s'han d'efectuar controlant la temperatura per, posteriorment, dur a terme la corresponent correcció.

* Materials i reactius: Tubs de plàstic amb tap (10), mostra de sòl, balança, espàtula, aigua milliQ, pipeta, pipetejador, agitador, conductímetre, filtres d' 0,45 µm.

* Procediment: Per conèixer la conductivitat elèctrica dels sòl s'utilitza un conductímetre. Es prepara un extracte filtrat d'una solució sòl:aigua 1:10 agitada mecànicament durant 2 hores. Es pesa, aproximadament, 1 g de sòl amb l'ajuda de la balança i l'espàtula. S'afegeix al tub juntament amb 10 ml d'aigua miliQ. Es preparen 5 replicats, i es posen a l'agitador durant 2 h. Un cop passades les dues hores, es filtra la solució, traspasant el líquid a un altre tub. Amb l'ajuda del conductímetre es fan les mesures corresponents.

* Resultats:

| Rèplica | Pes (g) | Temp. (°C) | Cond. (µS/cm) |
|---------|---------|------------|---------------|
| A | 0'99041 | 25'3 | 69'6 |
| B | 0'99725 | 25'0 | 83'3 |
| C | 0'99999 | 24'9 | 80'1 |
| D | 1'01344 | 24'7 | 79'1 |

Figura 19: Resultats de les rèpliques de l'anàlisi de conductivitat de la mostra. Font: Elaboració pròpia

* Discussió: es descarta la rèplica A ja que a causa d'un error de mesura té un valor de conductivitat llunyà a la resta de replicats. Amb la resta de rèpliques ens surt una conductivitat mitjana de 80,83 µS/cm que és el mateix que 0,8083 dS/m. A partir de la figura 17 podem dir que el nostre sòl té una conductivitat normal. Un excés de sals solubles al sòl, sobretot de Na, redueix el poder d'infiltració ja que aquestes sals actuen afecten a la pressió osmòtica del medi, frenant l'absorció tant d'aigua com d'altres ions presents al sòl. Com a conseqüència

d'aquesta reducció de la infiltració, l'estructura del sòl es degrada, disminuint considerablement la capacitat d'aquest per mantenir la coberta vegetal.

| Conductivitat elèctrica (dS/m) | Classificació |
|--------------------------------|-------------------|
| 0-2 | Normal |
| 2-4 | Lleugerament salí |
| 4-8 | Mitjanament salí |
| 8-16 | Fortament Salí |

Figura 20: Taula de classificació dels sòls segons la conductivitat elèctrica. Font: [11]

Taula resum de la caracterització del sòl:

| | Humitat (%) | pH, acidesa activa | Conductivitat ($\mu\text{S}/\text{cm}$) | Carbonats (%) |
|----------------------|-------------|--------------------|---|-------------------|
| Resultat | 6,75 | 8,03 | 80,83 | 7,97 |
| Interpretació | Sòl sec | Sòl bàsic | Sòl normal | Baix en carbonats |

Figura 21: Taula resum caracterització del sòl. Font: elaboració pròpia

3.2.3. Preparació dels cosmes

Tamiset

Un cop la mostra arriba al laboratori es procedeix a tamisar-la amb un sedàs inferior a 2 mm per tenir la mostra amb la mida de partícula adequada i homogènia per tal de millorar la precisió del seu tractament posterior. També es considera una mida de partícula òptima per a l'extracció en microones. Abans de tamisar, els fragments més grossos i les restes de matèria orgànica i/o brossa que es trobin s'han de retirar ja que podrien interferir a les anàlisis. Quan tenim tot el sòl tamiset el deixem reposar durant 7 – 10 dies abans de preparar els cosmes per tal de recuperar l'activitat bacteriana que es pot haver vist afectada pel procediment de presa de mostra i tamiset. Durant aquests dies s'ha d'anar mantenint la humitat del sòl afegint-hi aigua per tal que els bacteris puguin recuperar la seva activitat. [16]

Preparació

Un cop la mostra està tamisada es pot procedir a preparar els cosmes. Els cosmes són una eina experimental que intenta reproduir l'estat real del sòl a escala de laboratori. En aquest cas, els cosmes es preparen per tal de seguir la cinètica de degradació dels PAH i l'aparició dels seus derivats hidroxilats en presència i absència de metalls pesants. Els PAH i els metalls pesant són dos tipus de contaminants (orgànics i inorgànics, respectivament) que, fins ara, no s'han estudiat alhora en un cosme. Es preparen diferents cosmes per poder avaluar-ne la concentració de totes les espècies a diferents temps, des del temps 0, passant pels 3, 7, 10, 14, i 21 dies, així com a 1 mes, 2 i 3 mesos.

Un cosme correspondrà a 100 g de sòl sec, que contindrà els microorganismes originalment presents a la mostra, els PAHs i, en alguns casos, els metalls pesants. És necessari introduir de forma artificial els PAHs ja que es troben normalment en concentracions molt baixes al sòl, per sota dels límits de quantificació de la tècnica GC-MS utilitzada, la qual cosa no ens permetria una observació clara de la seva evolució.

Els PAHs no són solubles en aigua per tant s'han de dissoldre prèviament en algun dissolvent orgànic, en el nostre cas acetona i s'han d'afegir al sòl. Però no es pot afegir sobre els 100 g de sòl amb els microorganismes ja que moririen, així que es farà sobre una porció de sòl prèviament esterilitzat a l'autoclau. Per tant, dels 100 grams de sòl sec que tindran els cosmes, se separaran inicialment 10 g i s'afegiran aquests 10 g de sòl estèril sec als quals hi haurem afegit els PAHs dissolts en acetona.

La quantitat de PAHs a introduir no és un número aleatori. En un estudi previ es van analitzar les concentracions inicials de PAHs a la mostra del sòl, i es va trobar que contenia aproximadament 0,200 mg de PAHs (com a suma dels 5 PAHs estudiats) per cada quilogram de sòl. Es va decidir dopar 500 vegades més del que hi havia, per tant, es necessita un nivell de concentració final de 100 mg/kg. Donat que son 5 els PAHs d'estudi, caldrà afegir doncs 20 mg de cada un d'ells per quilogram. Com que el nombre de cosmes a preparar és de 50 (de 100 g cadascun impliquen 0,5 quilograms de sòl totals), això vol dir que es necessiten 10 mg de cada PAH a diluir amb l'acetona. Però com que es barregen 10 g de cosme dopat amb aproximadament 90 g de sòl humit, hi ha una dilució aproximadament de 1/10 i cal pesar 100 mg de cada PAH per tenir una concentració de 100 mg/kg al sòl final. Un cop hem afegit la dissolució dels PAHs als 10 g de sòl sec estèril es deixarà evaporar durant una nit el dissolvent, i a la foscor per així evitar possibles fotooxidacions dels PAHs.

A continuació, per arribar als 100 g de sòl sec en faltarien 90 g, però com que el sòl que s'afegeix en segon terme és un sòl humit i no estèril, s'ha de calcular quina quantitat de sòl humit cal afegir, sabent la humitat del mateix, perquè corresponguin a 90 g de sòl sec. Segons la figura 13 la mostra té un 6,75% d'humitat i per tant la massa de sòl humit a introduir (per tenir 90 g de sòl sec) és:

$$x = \frac{9000}{100 - \%humitat} = \frac{9000}{100 - 6,75} = 96,51 \text{ g}$$

A més dels PAHs introduïts, és habitual en estudis de degradació, augmentar les condicions d'humitat per afavorir l'activitat bacteriana i també per assegurar que tots els cosmes parteixen d'una humitat controlada i equivalent. A més, també ens servirà per a introduir els metalls pesants en els cosmes que ho requereixin. Per això, un cop es tingui el cosme preparat, introduïrem aigua per tal d'arribar al 50% de la capacitat màxima de retenció de l'aigua (CMR) del sòl estudiat. Segons la figura 23 la mostra té un 40,3% de CMR i, per tant, el 50% d'aquest és 20,15% d'humitat. El sòl del cosme haurà de pesar, per tenir aquesta humitat:

$$x = \frac{10000}{100 - 20,15} = 125,23 \text{ g}$$

L'aigua ha afegir correspondrà als grams (o mil·lilitres) que calen per arribar a aquest pes:

$$\begin{aligned} &125,23 \text{ g} - (g \text{ sòl humit} \\ &+ g \text{ sòl sec estèril dopat}) = 125,23 \text{ g} - (96,51 + 10) \\ &= 18,7 \text{ g d'aigua sec dopat}) = 125,23 \text{ g} - (96,51 + 10) = 18,7 \text{ g d'aigua} \end{aligned}$$

En resum, els cosmes estan formats per:

- * 10 g de sòl sec estèril contenint la quantitat adequada de la dissolució de PAHs
- * 96,50 g de sòl humit
- * 18,7 ml d'aigua a pH neutre

Tot això s'agita i s'homogeneïtza durant una estona per assegurar-se que la distribució és igual a cada part del cosme. A la figura 24 es poden veure els cosmes un cop homogeneïtzats i preparats per analitzar o per reposar.

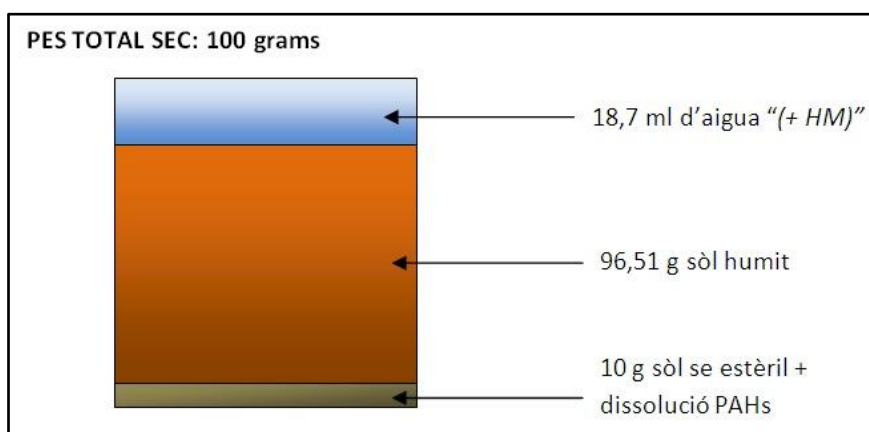


Figura 22: Esquema preparació cosme pel seguiment de la degradació.
Font: elaboració pròpia.

Per l'estudi de l'efecte de la presència de metalls pesants en la degradació dels PAHs, alguns cosmes es preparen de tal manera que cal afegir-hi una certa quantitat d'un grup de HM escollit (dopatge). Els metalls escollits i la seva quantitat es dedueixen a partir de les dades de continguts de metalls contaminants en sòls urbans/industrials. Aquests HM s'addicionen en solució.

| Rèplica | Humitat (%) | CMR (%) |
|---------|-------------|------------|
| A | 6,80 | 40,50 |
| B | 6,78 | 40,64 |
| C | 6,76 | 40,75 |
| D | 6,71 | 39,59 |
| E | 6,71 | 39,97 |
| Mitjana | 6,75 ± 0,05 | 40,3 ± 0,6 |

Figura 23: Humitat i CMR per tal de preparar els cosmes. Font: Elaboració pròpia



Figura 24: Fotografies dels cosmes ja preparats, oberts i a la foscor. Font: Elaboració pròpia

criteris de dopatge dels metalls pesants

Per tal de fer el dopatge amb metalls pesants es fa un estudi previ de la mostra per veure com els microorganismes suporten o no la seva presència a concentracions relativament més altes a les inicials del sòl d'estudi. A partir de la informació extreta de diferents articles ([14], [16]) primer es calculen les diferents concentracions a dopar de cada PAH. Seguidament, es realitzen tres experiments de cultius dels microorganismes en plaques on el medi de cultiu en presència del sòl s'ha dopat a diferents concentracions de PAH (100 mg/kg, 250 mg/kg i 500 mg/kg) per tal de veure si encara hi pot haver creixement bacterià en algun dels casos. El resultat d'aquest experiment és que no s'aprecia creixement bacterià, és a dir, que aquesta quantitat de metalls representa un tòxic massa elevat, el qual aconsegueix impedir el desenvolupament de l'activitat bacteriana.

Cal tenir en compte que fins aquest moment s'havia treballat amb el contingut total del sòl. En canvi, de la quantitat de metalls pesants que es troben al sòl no tota és disponible pels organismes que hi viuen. Es poden, per tan, diferenciar tres fraccions de cada metall pesant dins d'un mateix sòl. Hi ha la fracció biodisponible que està formada per la part intercanviable i la part hidrosoluble, i la fracció estructural. La fracció intercanviable és la que poden utilitzar els organismes per nodrir-se, i la fracció hidrosoluble és la fracció que es dissol amb l'aigua del sòl, i. Quan a la fracció estructural és la que no està disponible pels microorganismes (forma part de les roques i dels minerals). Es realitza un estudi per saber quin percentatge hi ha de cada fracció a la mostra. Es troba que hi ha 566,8 mg HM/kg sòl (metalls totals estudiats) i d'aquesta, un 4,97% és fracció intercanviable i un 0,17% forma part de la fracció soluble. La suma d'aquestes dues és la fracció biodisponible (5,14%). Com que no hi ha estudis previs on s'analitzin conjuntament la degradació dels PAHs i els HM es decideix dopar el sòl amb el doble de la quantitat biodisponible trobada a la mostra en funció del nivell de concentració de cada metall.

Els metalls pesants estudiats són el Crom, el Manganès, el Cobalt, el Níquel, el Coure, el Zinc, l'Arsènic, el Cadmi i el Plom. A la taula següent es troba la quantitat de metalls pesants introduïts als cosmes:

| Metalls | Concentració afegida (mg/kg) |
|----------|------------------------------|
| Manganès | 30 |
| Zinc | 1 |
| Coure | 0,5 |
| Plom | 0,1 |
| Crom | 0,05 |
| Cobalt | 0,05 |
| Níquel | 0,05 |
| Cadmi | 0,05 |
| Arsènic | 0,05 |

Figura 25: Nivells de HM adicionats als cosmes. Font: Elaboració pròpia

3.2.4 Anàlisi cosme

Per procedir a les anàlisis dels cosmes cal tractar-los adequadament per tal d'aconseguir que tots els PAHs, els OH-PAHs i els HMs continguts en cada cosme passin a una fase líquida fàcil de determinar bé per GC-MS pels dos primers casos, bé per ICP-MS en el cas dels HMs. Per això, cal primer molturar el cosme, després es procedeix a l'extracció assistida per microones en el cas dels PAHs i els OH-PAHs, o a una digestió àcida també amb l'acció dels microones en el cas dels HM.

Molturat

Les mostres dels cosmes abans de l'anàlisi cal que siguin homogènies, de manera que, si es prenen alíquotes, aquestes siguin representatives. Aquesta homogeneïtat s'aconsegueix més fàcilment treballant amb mides de partícula petites, de manera que el molturat és una bona eina ja que redueix la mida de partícules d'una mostra sòlida fins arribar a l'estat de pols (molturades). El molturat implica una millor representativitat de la mostra, especialment en aquells casos, bastant freqüents, en què es treballa amb poca quantitat de substància. Així, abans de fer el tractament de cada cosme previ al seu anàlisi (mitjançant les extraccions assistides per microones), s'han d'assecar i molturar. S'assequen a 150 °C durant tota la nit en una estufa, i es molturen amb un molturador seguint el procediment descrit en el manual de l'equip.

Preparació recta de calibrat

Cal preparar els patrons que serviran per poder construir la recta de calibrat a emprar pel calibrar el GC-MS. En la preparació dels patrons es realitza un número determinat de dilucions per tal de poder cobrir un rang de concentracions determinat, i així poder realitzar el calibrat que s'utilitzarà per fer l'anàlisi quantitativa dels PAHs i OH-PAHs. Cal tenir present que quan es realitza l'anàlisi de les mostres, la concentració d'aquestes ha d'estar dins d'aquest rang de

calibrat establert. Tenint en compte això, s'ha triat preparar 7 patrons de calibrat de 7 concentracions diferents: 0,010, 0,025, 0,050, 0,100, 0,250, 0,500 i 1 mg/L, tan pels PAHs com per l'anàlisi dels OH-PAHs.

Procediment d'anàlisi:

* Anàlisi PAH en sòls:

Per fer l'anàlisi dels PAHs en sòls, s'han de pesar 1,5 g de sòl (assecat, molturat i tamisat) i afegir-ho al vas del microones. Un cop tenim el sòl pesat s'afegeix el patró intern (20 µL de Fenantrè d-10 100 ppm de concentració) i es deixa evaporar el solvent per tal que s'incorpori al sòl. A continuació s'afegeix la mescla de solvents extractants que són 20 mL d'acetona:toluè (1:1). Es tanquen hermèticament tots els vasos i es posen al microones. Al vas de referència s'introdueix la sonda de pressió i la de temperatura per tal de controlar en tot moment del procés aquestes dues variables. El mètode és de 30 min a 120°C a 1200 W. Un cop s'ha acabat l'extracció al microones i s'ha deixat refredar (aproximadament 30 min), es filtra la solució amb uns filtres de 0,45 µm per tal de treure restes que puguin haver quedat de sòl. Ja la tenim a punt la mostra per fer l'anàlisi al GC/MS.

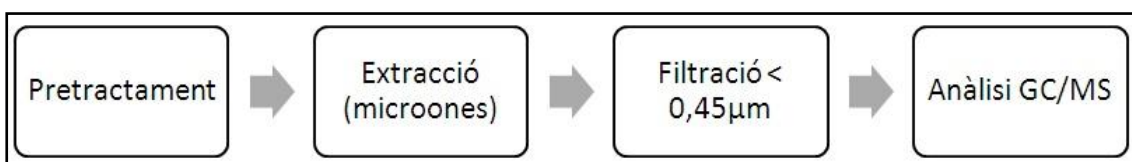


Figura 26: procés d'anàlisi PAHs. Font: Elaboració pròpia

El mètode de ionització és per impacte electrònic. La separació es durà a terme amb una columna TRMS-5 30 m x 0,25 mm I.D., 0,25 µm de gruix de film (Thermo Fisher Scientific, Barcelona, Espanya).

La programació del forn comença a 60°C de temperatura durant 5 min, i s'augmenta fins a 290°C amb una rampa de 8°C/min, on es manté durant 2 min. La injecció d'1 µL es fa en mode *splitless*, amb vàlvula split tancada durant 1 min. El flux del gas portador, Heli, es manté constant a 1,5 mL/min. La temperatura de l'injector, *transfer line* i la font de ionització són de 275°C, 300°C i 225°C respectivament. L'adquisició del cromatograma es va fer utilitzant *Full Scan* pels patrons, a un ritme de 2 scan/s i en mode *Single Ion Monitoring* (SIM). La detecció i integració dels pics es va fer utilitzant el programa *Xcalibur Thermo Scientific*.

Anàlisi OH-PAH en sòls:

En l'anàlisi dels hidroxil - PAHs es volen aconseguir dades que permetin comparar la degradació dels PAHs en diferents situacions (en absència i en presència de metalls pesants). Es procedeix a fer l'extracció amb microones, seguit de la sililació amb BSTFA i l'anàlisi per cromatografia de gasos acoblada a l'espectrometria de masses (Sililació BSTFA - GC/MS)

Anàlisi Sililació BSTFA - GC/MS:

El procediment és el mateix que el descrit pels PAHs (a l'apartat anterior), fins el moment de la filtració. En aquest cas, per poder analitzar els OH-PAHs per GC/MS, s'ha de fer un pas previ al GC/MS, i és que s'han de sililar les mostres. Per fer això s'ha de concentrar la mostra a l'evaporador rotatori fins a uns 1-2 mL. S'enrasa en un matràs aforat de 2 ml amb toluè. A continuació, s'introdueix a un vial 950 µL de l'extracte i 50 µL de l'agent sililant, BSTFA. Es col·loquen al bany de silicona (per tal de dur a terme el procés de sililació) a 60°C i s'agita a 330 rpm durant 30 minuts, per tal d'aconseguir la sililació dels OH-PAHs de la mostra i poder-los analitzar al GC/MS.

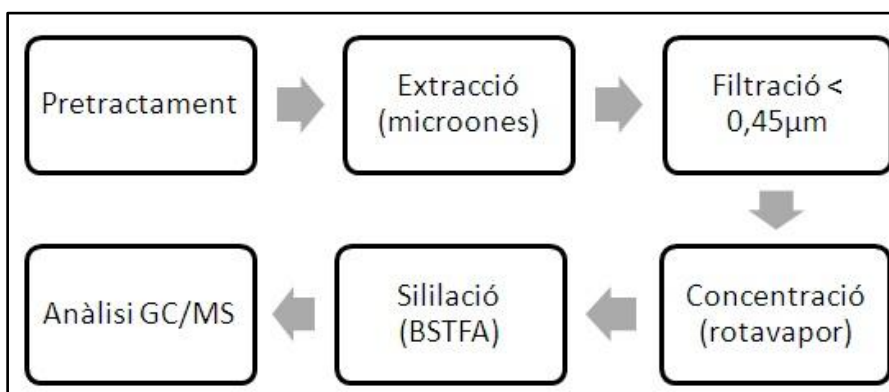


Figura 27: procés d'anàlisi Sililació BSTFA – GC/MS. Font: elaboració pròpia

El mètode per als OH-PAHs és similar al dels PAHs. Les dades de la columna són les mateixes. El flux del gas portador es manté constant a 1 ml/min. El forn de la columna la manté fa mantenir la columna constant a 25°C. L'adquisició del cromatograma es va utilitzant *Full Scan* pels patrons a un ritme de 2 scan/s i en mode *Single Ion Monitoring* (SIM) per a les mostres. La detecció i integració dels pics es va fer utilitzant el programa *Xcalibur Thermo Scientific*.

4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

La identificació dels PAH es va fer tant per temps de retenció com pel seu espectre de masses, mitjançant la Cromatografia de Gasos acoblada a l'Espectrometria de Masses (GC-MS). La quantificació dels PAH d'estudi es va realitzar mitjançant la construcció de la recta de calibrat emprant Fenantrè-d₁₀ com a patró intern. Es van seleccionar i preparar 7 patrons entre 0,010 ppm i 1 ppm. S'analitza primer un blanc i es segueix amb l'anàlisi d'aquests patrons de la recta de calibrat, i es representen les dades de l'àrea del pic obtingut per cada PAH en relació amb l'àrea del patró intern en funció de la concentració de PAH. A la Figura 28 es mostren les rectes de calibrat de cada compost. S'avaluen els paràmetres de la regressió lineal de la recta de calibrat per cada PAH, de manera que es determinen l'ordenada a l'origen i el pendent de les equacions lineals corresponents, així com l'ajust de la recta, i es calculen tan el límit de detecció (LOD) com el quantificació (LOQ). A la Figura 29 es poden veure els paràmetres de regressió de la recta de calibrat per cada PAH d'estudi.

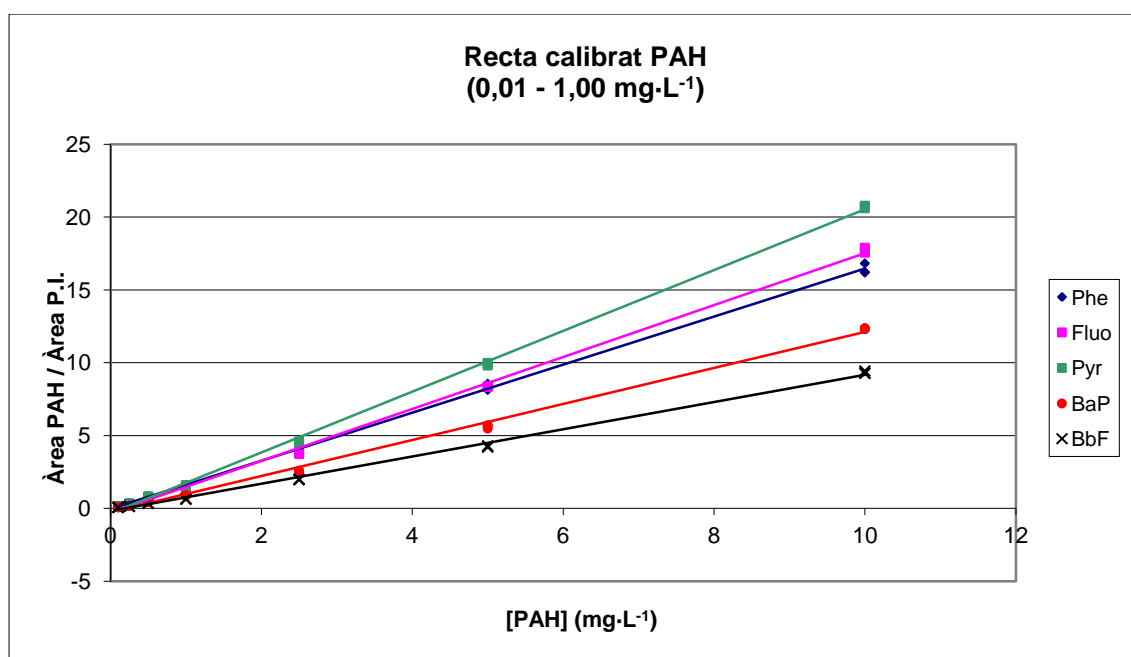


Figura 28: Recta de calibrat pels PAHs entre 0,01 i 1 ppm. Font: elaboració pròpia

| Compost | Rang estudiat (mg/L) | y=ax+b | | r ² | LOD (µg/L) | LOQ (µg/L) |
|---------|----------------------|---------------|--------------|----------------|------------|------------|
| | | a ± SD | b ± SD | | | |
| Phe | 0,010 – 1,000 | -0,03 ± 0,042 | 1,65 ± 0,010 | 0,9993 | 0,353 | 1,176 |
| Fluo | 0,010 – 1,000 | -0,31 ± 0,067 | 1,78 ± 0,015 | 0,9985 | 0,441 | 1,471 |
| Pyr | 0,010 – 1,000 | -0,33 ± 0,065 | 2,09 ± 0,015 | 0,9990 | 0,353 | 1,176 |
| BaP | 0,010 – 1,000 | -0,26 ± 0,063 | 1,24 ± 0,015 | 0,9973 | 1,941 | 6,471 |
| BbF | 0,010 – 1,000 | -0,19 ± 0,047 | 0,94 ± 0,011 | 0,9974 | 3,882 | 12,941 |

Figura 29: Taula amb els paràmetres de regressió de la recta de calibrat. Font: elaboració pròpia

A la figura 30 es mostra el cromatograma on s'observa que s'aconsegueix una bona separació dels PAH d'estudi, amb un temps total d'uns 36 minuts.

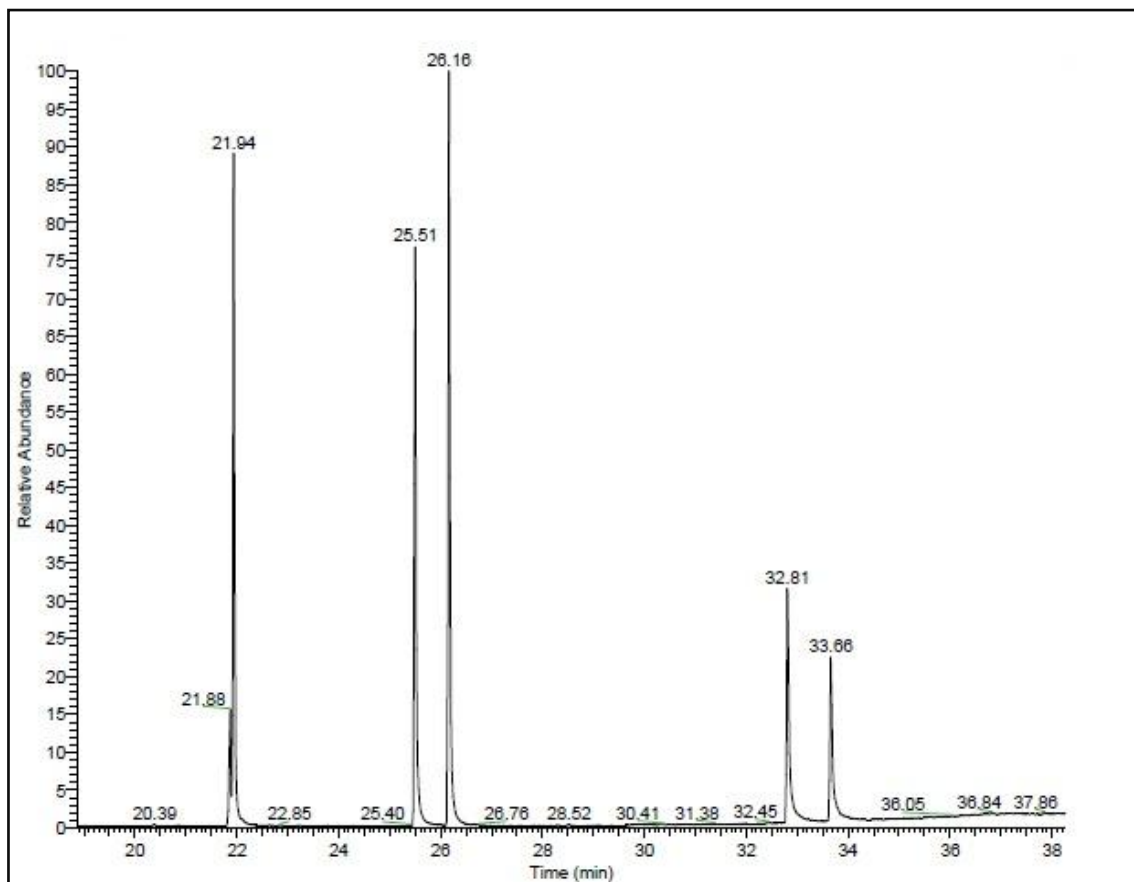


Figura 30: Cromatograma dels 5 PAHs estudiats. En minuts, Phe (21,94); Fluo (25,51); Pyr (26,16); BaP (32,81); BbF (33,66). Font: Xcalibur Thermo Scientific

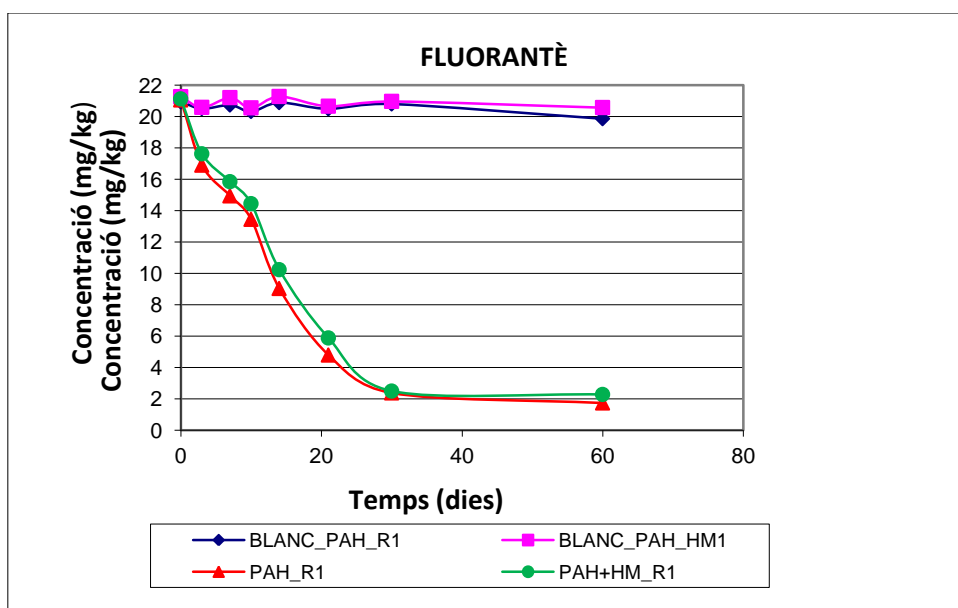
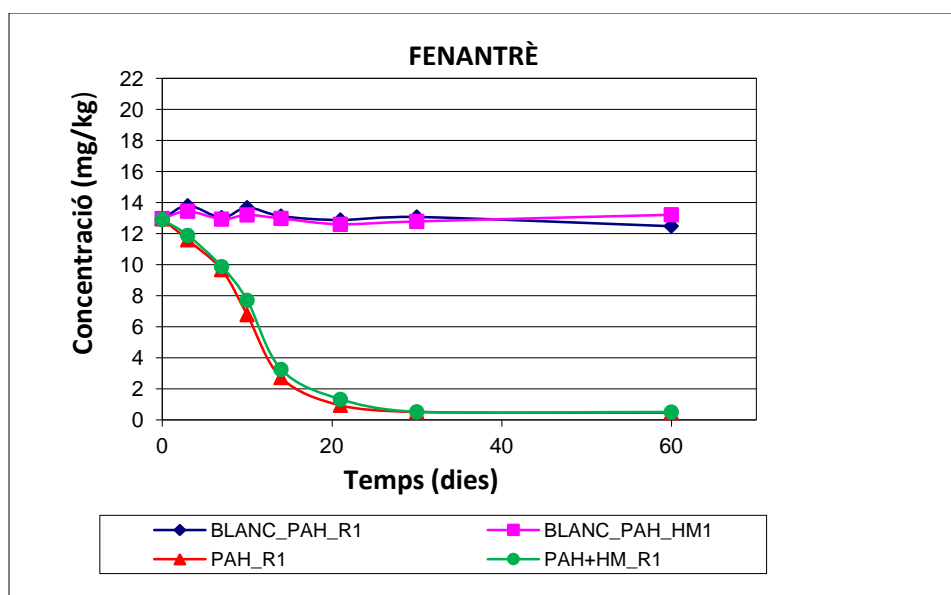
4.1 ANÀLISIS DE PAHS MITJANÇANT GC/MS

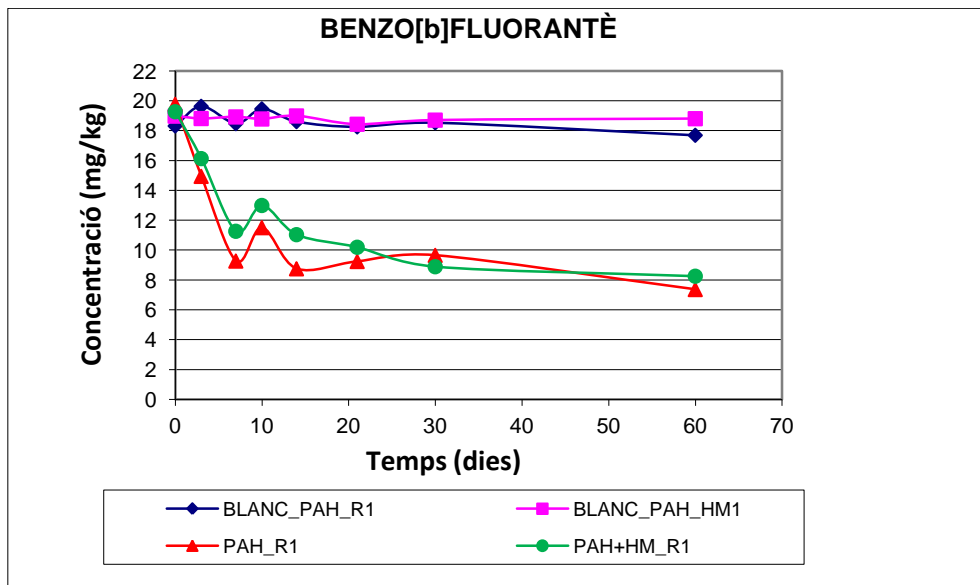
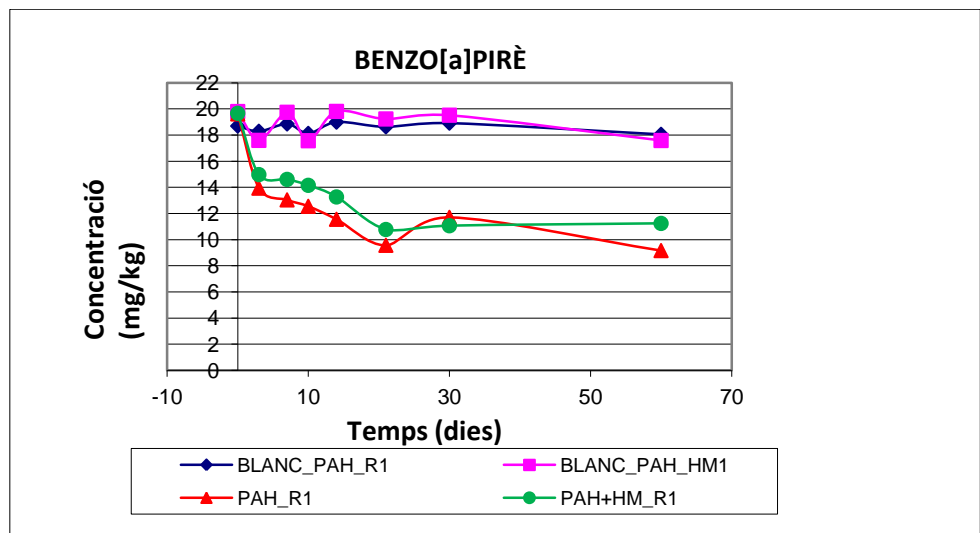
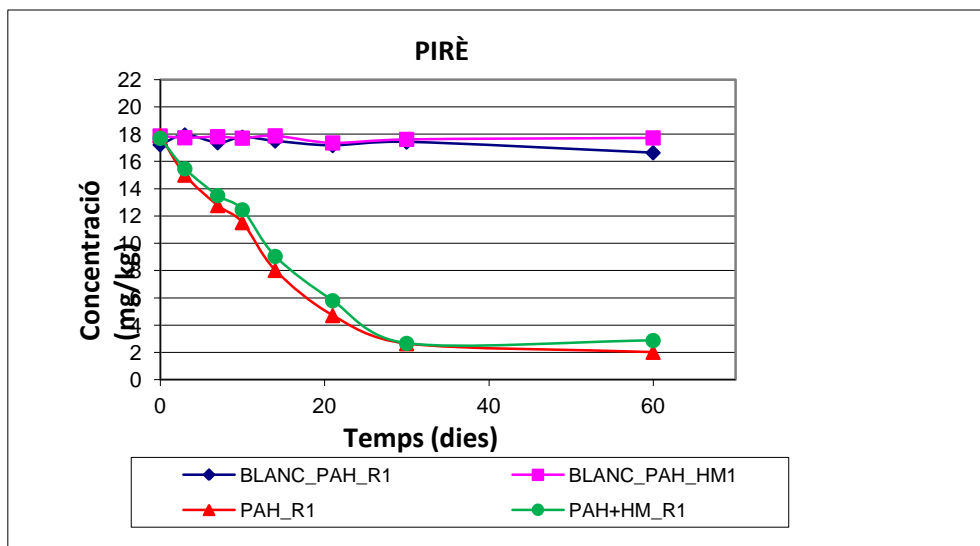
4.1.1. Influència de l'absència i la presència de Metalls pesants (HM) en la degradació dels PAH d'estudi:

Es compara el comportament dels PAHs en el sòl front el temps en cada cosme preparat (porció coneguda de sòl prèviament caracteritzat), bé en absència bé en presència de metalls pesants (HM).

* En els cosmes que no contenen HM afegits, els PAHs es degraden més ràpidament que en els cosmes als quals se'ls ha afegit una quantitat determinada de HM. Aquesta degradació en absència de HM és relativament més ràpida al principi, fins aproximadament 1 mes per a tots els PAHs d'estudi. A partir del mes, en la majoria dels casos (queda més confús el comportament pel cas del Benzo[b]Fluorantè, probablement degut a algun error experimental de mesura), la degradació dels PAH sembla estabilitzar-se o equilibrar-se, tant pels cosmes sense HM com pels cosmes amb HM.

* El fet que els cosmes que contenen certes quantitats de HM tinguin una degradació dels PAHs inicialment més lenta, probablement és degut a que els HM interfereixen en el procés de degradació. És conegut que els bacteris responsables d'aquest procés tenen certa tolerància als HM depenent de la quantitat d'aquests, de manera que inicialment la seva activitat bacteriana pot quedar més o menys inhibida per l'acció tòxica dels metalls pesants. Els bacteris, d'altra banda, són capaços d'adaptar-se als canvis del medi com és la incorporació dels metalls al sòl. Així, a partir d'un cert moment hi ha una recuperació de la seva activitat bacteriana, fet que permet que la degradació dels PAH segueixi amb més o menys normalitat [14, 16, 17]. En qualsevol cas, les diferències detectades en els casos d'estudi en absència o presència de metalls són petites. Probablement augmentant la concentració de metalls s'aconseguiria que la inhibició fos més alta i es veurien diferències més grans entre els dos tipus de sistemes (absència i presència de HM).





* La diferent velocitat de degradació dels PAHs en presència o absència de HM varia amb el pes molecular. A mesura que augmenta el pes molecular dels PAHs la degradació és menor. Quan fem les anàlisis de la composició dels cosmes a temps 0 i 3 dies, la diferència de degradació és bastant petita en tots els casos. A partir del setè dia és quan es poden veure més diferències entre els PAHs. Així, pel Fenantrè (PM: 178,2) és on es veuen les línies de degradació més juntes durant tot el procés (dels 0 als 60 dies). En canvi pel Benzo(b)Fluorentè (BbF) (PM:252,3) i/o pel Benzo(a)Pirè (BaP) (PM:252,3) a partir del setè dia la degradació dels PAHs en absència de HM sembla incrementar-se i diferenciar-se lleugerament en comparació amb presència dels HM.

* El Fenantrè té el pendent de les corbes més inclinat que la resta de compostos. Als 30 dies la concentració és gairebé 0 cosa que en la resta de compostos no s'observa. Això s'explica ja que els PAHs de més anells (i de més pes molecular) costen més de degradar. A part, el fenantrè forma en la seva estructura una regió badia cosa que facilita l'anclatge de molts bacteris i una ràpida degradació [20].

* A partir dels 30 dies no s'observa variació en la concentració dels PAHs en tots els casos, s'estabilitza el seu procés de degradació. S'observa doncs que entre els 30 i els 60 dies pràcticament no hi ha degradació (s'observen línies rectes en els gràfics corresponents als diferents compostos), fet que vol dir que no varia la concentració del PAH en qüestió).

* D'altra banda, a partir dels 30 dies les línies de degradació dels PAHs en absència i en presència dels metalls pesants s'ajunten, a part d'estabilitzar-se. El BaP i el BbF triguen més en ajuntar-se que la resta de PAHs, però amb el pas del temps tots acaben igualant el seu comportament tan si hi ha HM com si no.

* A la figura 31 es pot veure un cromatograma de l'anàlisi de PAH a temps de 3 dies. Es poden veure perfectament els 5 compostos estudiats així com el patró intern fenantrè d-10.

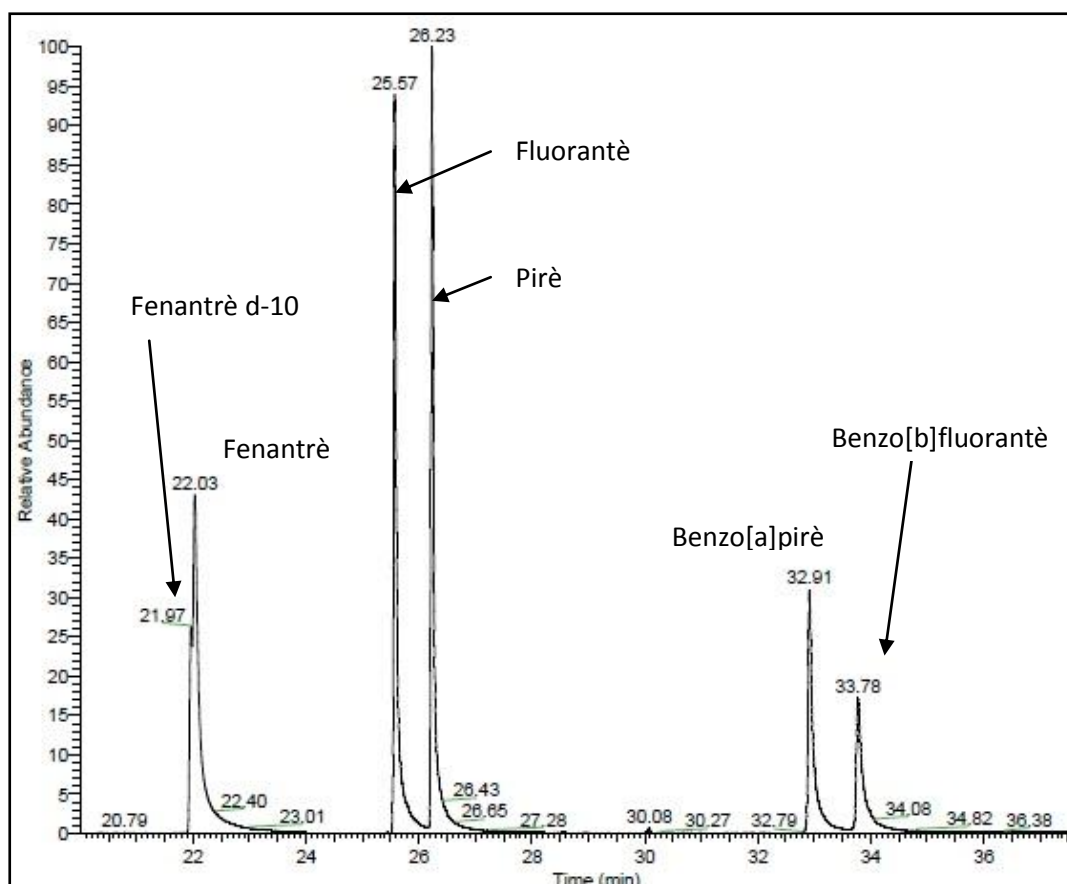


Figura 31: Cromatograma dels 5 PAHs estudiats (a temps 3 dies) amb patró intern. Font: Xcalibur Thermo Scientific

4.2. ANÀLISIS DELS OH-PAHS MITJANÇANT GC/MS (PRÈVIA SILILACIÓ)

La identificació dels OH-PAH es va fer tant per temps de retenció com pel seu espectre de masses, igual que els PAHs. La seva quantificació es va realitzar mitjançant calibrat amb un patró intern (Phenanthrè-d₁₀). A la figura 32 es mostren les rectes de calibrat de cada compost i a la figura 33 es poden veure els paràmetres de regressió de la recta de calibrat.

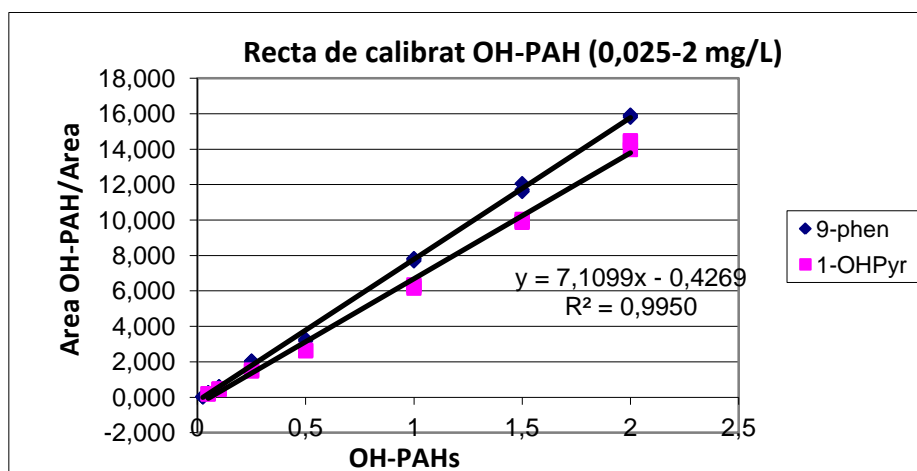


Figura 32: Recta de calibrat pels PAHs entre 0,025 i 2 ppm. Font: Elaboració pròpia

| Compost | Rang estudiat (mg/L) | y=ax+b | | r2 | LOD(µg/L) | LOQ(µg/L) |
|---------|----------------------|----------------|--------------|--------|-----------|-----------|
| | | a ± SD | b ± SD | | | |
| 9-PHE | 0,025-2,000 | - 0,22 ± 0,062 | 8,00 ± 0,063 | 0,9986 | 0,001 | 0,003 |
| OH-PYR | 0,025-2,000 | - 0,43 ± 0,126 | 7,11 ± 0,119 | 0,9947 | 0,004 | 0,012 |

Figura 33: Taula amb els paràmetres de regressió de la recta de calibrat dels OH-PAHs. Font: Elaboració pròpia

4.2.1. Influència de l'absència i la presència de Metalls pesants (HM) en l'aparició dels OH-PAH arrel de la degradació dels PAH d'estudi

En l'anàlisi detallat del cromatograma dels OH-PAH, s'observa la presència d'aquests compostos, però en unes quantitats tan baixes que es troben per sota dels límits de quantificació de la tècnica. Mirant el gràfic de degradació, i veient que els valors del blanc són superiors als de les mostres, ens permet dir que ens trobem a concentracions tan baixes que no podem obtenir una sèrie de valors quantitius fiables. Per tan, no podem aventurar-nos a justificar numèricament l'aparició dels OH-PAH com a producte de la degradació de PAH, si bé sí que es pot assegurar la seva presència a nivell qualitatiu.

Aquest fet fa que no es puguin donar valors de concentració estadísticament interpretables donat que no són fiables, per tan no té massa sentit fer-ne la seva representació gràfica. Com a exemple es representa la concentració d'Hidroxi-Pirè en funció del temps a la Figura 35 per mostrar aquesta poca fiabilitat dels resultats obtinguts, tal i com s'ha comentat.

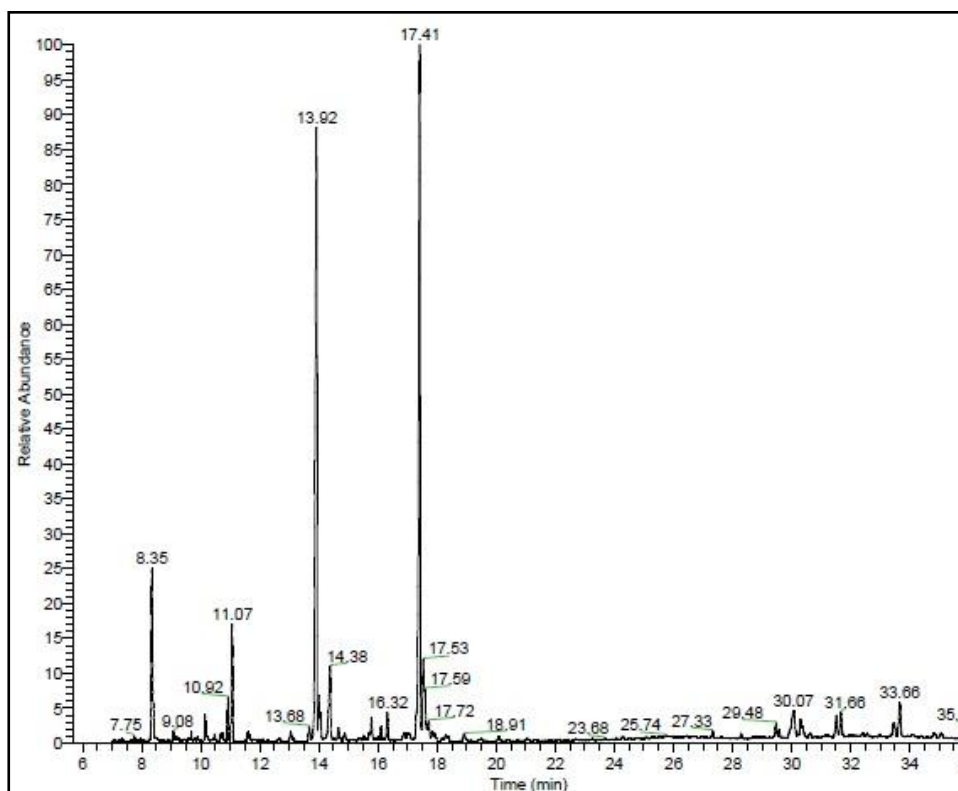


Figura 34: Cromatograma dels OH-PAH a temps de 3 dies. Font: Xcalibur Thermo Scientific

Pel que fa al cromatograma corresponent (Figura 34), es poden veure una sèrie de pics on només s'han assignat els corresponents a les masses d'interès dels nostres compostos. Per saber a què correspon cada pic, caldria fer l'espectre de masses complet i poder utilitzar llibreries de compostos per esbrinar-ne l'estructura. També és possible, però, que alguns d'ells corresponguin a residus de la sililació o inclús a altres derivats hidroxilats sililats dels compostos d'interès (Fenantrol: 12.52 min, Hidroxi-Pirè: 18.87 min).

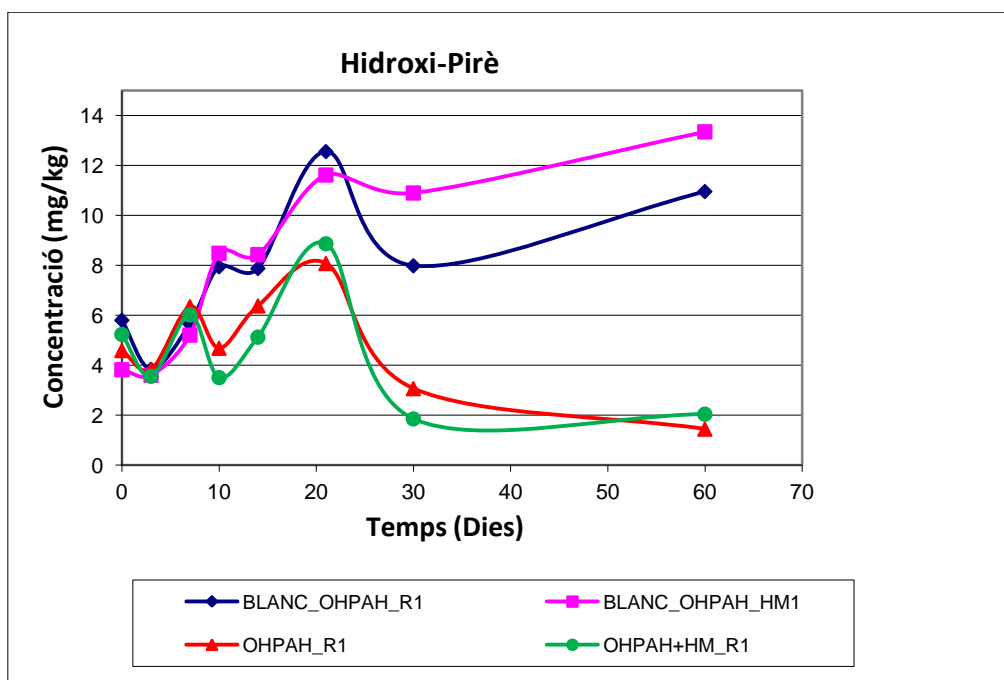


Figura 35: Gràfic de l'OH-Pirè fins a temps 2 mesos. Font: Elaboració pròpia

5. CONCLUSIONS

A partir dels resultats obtinguts durant la posada a punt del procediment d'anàlisi dels PAHs i OH-PAHs seleccionats en mostres de sòls contaminats, així com el seguiment de la presència de metalls pesants (HM) i el seu paper en la degradació dels PAHs a OH-PAHs, les conclusions més importants que es poden extreure es detallen a continuació:

- Tots els PAHs de l'estudi es degraden als seus corresponents OH-PAHs, tant si en el sòl hi ha presència de HM com si no. La degradació és diferent en els dos casos. Així, s'observa com inicialment la presència de HM frena aquest procés de la degradació, probablement degut a que afecten al correcte funcionament dels microorganismes (bacteris) que hi intervenen (efecte en els cosmes sense HM sembla ser més ràpida, possiblement a causa de l'efecte tòxic dels HM). Un cop els bacteris s'adapten al medi en presència de HM, s'observa com s'iguali el comportament dels dos tipus de sistemes d'aquests contaminants, però s'estabilitzen al cap d'un temps.

- Els PAHs de pes molecular més baix es degraden més ràpidament. Els sistemes aromàtics més simples són de més fàcil/ràpida degradació, probablement degut al fet de contenir en l'estructura del PAH una regió badia que contribueix a augmentar la velocitat de degradació. Els sistemes aromàtics més simples són de més fàcil degradació.

- Tot i observar-se la presència d' OH-PAHs, no és possible dur a terme una quantificació adequada i per tant no s'ha pogut seguir la seva cinètica d'aparició d'aquests com a resultat de la degradació de PAHs.

- El mètode ha demostrat ser eficient per la determinació de PAH, amb bons límits. El límit de detecció al qual podem arribar oscil·la entre 0,353 i 3,882 ppb i el límit de quantificació es troba entre el 1,176 i 12,941 ppb en funció del compost.

6. BIBLIOGRAFIA

- [1] M.Seoáñez Calvo. *Contaminación del suelo: Estudios, tratamiento y gestión*. Ed. Mundi-prensa
- [2] Centre de Terminologia. *Diccionari de Química analítica*.. Enciclopèdia Catalana
- [3] W. Forsythe *Física de suelos: Manual de laboratorio*. Ed.IICA
- [4] O. Budevsky. *Fonaments de l'Anàlisi Química*. Edicions Universitat de Barcelona
- [5] Skoog; West; Holler. *Fundamentos de Química Analítica*. Ed. Reverté, S.A.
- [6] C.Baird. *Química Ambiental*. Ed. Reverté S.A.
- [7] T.G. Spiro; W.M. Stigliani. *Química Medioambiental*. Ed. Pearson.
- [8] R.Cela; R.A. Lorenzo; M^aC. Casais. *Técnicas de separación en Química analítica*. Ed. Síntesis
- [9] J.Porta; M.López-Acevedo; R.M. Poch. *Introducció a l'edafologia. Ús i protecció de sòls*. Ed. IEC. Mundi-Prensa
- [10] N. Bruch. *Estudi edàfic dels boscos joves de pi negre del Parc Nacional d'Aigüestortes i Sant Maurici*. (TFC)
- [11] L.Martínez. *Interpretació dels resultats de l'anàlisi de terra*. Unió de pagesos de Mallorca.
- [12] Elisabeth de Oliveira. *Sample preparation for atomic spectroscopy: evolution and future trends*.
- [13] Josette-Nicole Mahy Gehenne. *Desarrollo de un método de anàlisis por cromatografia de gases y espectrometría de masas combinadas para el estudio del metabolismo de la histamina*.
- [14] Angle et al. *Bacterial resistance to heavy metals related to extractable an total metal concentrations in soil and media*. Soil Biol. Biochem.
- [15] Caracterización de muestras. Centro GTS.
- [16] Holtan-Hartwig et al. *Heavy metals tolerance of soil denitrifying communities: N₂O dynamics*. Soil Biology & Biochemistry.
- [17] Almas et al. *Changes in tolerance of soil microbial communities in Zn and Cd contaminated soils*. Soil Biology & Biochemistry
- [18] Zhang et al. *Microbial PAH-Degradation in Soil: Degradation Pathways and Contributing Factors*. Pedosphere.

[19] A. Tiehm; S. Schüle. *Intrinsic Aromatic Hydrocarbon Biodegradation for Groundwater Remediation*. Oil & Gas Science and Technology.

[20] Narro et al. *Metabolism of Phenanthrene by the Marine Cyanobacterium Agmenellum quadruplicatum*. Applied and environmental microbiology.

Bibliografia web:

[21] <http://www.soilandplantlab.com/espanol/soilsam.htm>

[22]

<http://www20.gencat.cat/portal/site/mediambient/menuitem.64be942b6641a1214e9cac3bb0c0e1a0/?vgnextoid=06a71de6eb927210VgnVCM1000008d0c1e0aRCRD&vg>

[23] http://www.equiposylaboratorio.com/sitio/contenidos_mo.php?it=3081

[24] http://www.encyclopedia.cat/fitxa_v2.jsp?NDCHEC=0142538

[25]

http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/31813/JNMG_TESIS.pdf;jsessionid=350A71F907ED1307FDAC157DFA993265.tdx2?sequence=1

[26] http://www.ruralcat.net/c/document_library/get_file?uuid=13a65ea9-6958-4f0e-acef-d7e976e4878f&groupId=10136

[27] <http://www.slideshare.net/ezarzos2/el-sl-propietats-i-activitats>

[28] <http://www.infu.tu-dortmund.de/english/Projects/MIP>

[29] <http://es.scribd.com/doc/38027560/17/Hidroxilacion-aromatica>

[30]

http://www.gps.caltech.edu/~als/research/facilities_and_instrumentat/mars_xpress_microwave_extra.html

[31] <http://www.pasturasyforrajes.com/alfalfa/alfalfa-bajo-riego/plan-de-riego/calidad-del-agua>

[32] <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914010001165>

[33] <http://www.uib.es/depart/dqu/dquo/dquo2/pau/Cromatograf%92a/cromatograma.html>